(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 3 月 15 日 (15.03.2012)

(10) 国際公開番号
WO 2012/033112 A1

(51) 国際特許分類：
C12N 15/09 (2006.01) C12P 7/22 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2011/070325

(22) 国際出願日： 2011 年 9 月 7 日 (07.09.2011)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2010-201445 2010 年 9 月 8 日 (08.09.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): グリーンフエノール・高機能フエノール樹脂製造技術研究組合 (Green Phenol Technology Research Association) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 Kyoto (JP).

( ) 発明者; および
( ) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 湯川 英明 (YUKAWA, Hideaki) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 グリーンフエノール・高機能フエノール樹脂製造技術研究組合内 Kyoto (JP). 乾 将行 (NUI, Masayuki) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 グリーンフエノール・高機能フエノール樹脂製造技術研究組合内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル3階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, ML, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
– 国際調査報告 (条約第21条(3))
– 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i) 及び48.2(a)(viii))
– 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

WO 2012/033112 A1

(54) Title: CORYNEFORM BACTERIUM TRANSFORMANT AND METHOD FOR PRODUCING PHENOL USING SAME

(54) 発明の名称：コリネ型細菌形質転換体及びそれを用いるフェノールの製造方法

(57) Abstract: A transformant capable of producing phenol, wherein a gene encoding an enzyme having a tyrosine phenol-lyase activity has been transferred into a host Coryne bacterium glutamicum, can efficiently produce phenol from a saccharide employed as a starting material. More specifically, a method, which comprises a step for reacting the transformant in a saccharide-containing liquid reaction mixture under reduction conditions and a step for collecting phenol in the liquid reaction mixture, is preferred.

(57) 要約： チロシン フエノール-リアーゼ (tyrosine phenol-lyase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) に導入された、フエノール生産能を有する形質転換体は、糖類を原料として効率よくフエノールを製造できる。具体的には、この形質転換体を、還元条件下、糖類を含有する反応液中で反応させる工程と、反応液中のフエノールを回収する工程とを含む方法が好ましい。

明 細 書

発明の名称 :

コリネ型細菌形質転換体及びそれを用いるフエノールの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、フエノール生産技術に関する。さらに詳しくは、フエノール生産機能を付与するために特定の遺伝子操作が施されたコリネ型細菌の形質転換体、及びこの形質転換体を用いた効率的なフエノールの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 地球温暖化、及び化石資源枯渇問題を背景に、再生可能資源を原料とした化学品の製造は、バイオ燃料製造と並び、新産業バイオリファイナリーとして低炭素社会実現の重要な方策であることが認識され、大きな注目が集まっている。

しかし、再生可能資源を原料としたバイオフエノール生産は、乳酸やエタノールの生産と比較して、原料となる糖類から代謝反応段数が大変多いために生産性が低く、また生産物であるフエノールにより菌の増殖が阻害されたり、フエノールによる細胞毒性がある等の理由により、これまで工業的生産が不可能とされていた。

[0003] フエノールの重要な用途として、フエノール樹脂が挙げられる。フエノール樹脂は、フエノールとアルデヒド類との付加縮合反応により生成し、プラスチックの中でも最も古い歴史のある樹脂であり、その優れた耐熱性、耐久性等の特長から、現在でも自動車用金属代替材料、半導体封止材料、回路基板など様々な用途に用いられている。また、これまでフエノール樹脂は、原料のフエノールとアルデヒド類の反応性が極めて高く、得られる高分子が複雑な三次元網目構造になるため、ポリマーの精密構造設計やナノマテリアルへの展開が困難であり、高付加価値の用途への利用が難しいとされてきた。しかしながら、近年、高分子の物性理論やシミュレーションの急速な発展に

より、ネットワーク構造を精密化すればフエノール樹脂から高機能性材料の創製が可能となってきた。このような背景から日本におけるフエノール樹脂生産量も年々増加している。

[0004] フエノールの現在の工業的生産法 (クメン法) は、石油由来のベンゼンとプロピレンを原料とし、多量の溶剤類及び多量の熱エネルギーを必要とする、典型的な化学工業の高エネルギー消費型プロセスである。従って、地球環境保全や温室効果ガス削減の観点から、二酸化炭素排出が少ない省エネルギー型で、再生可能資源から製造でき、低廃棄物排出の環境調和型プロセスの開発、即ちバイオフエノール製造技術確立が急務となっている。

これまで自然界においてフエノール生産菌は報告されていない。

[0005] 遺伝子組換え菌によるフエノール生産技術としては、非特許文献 1 が挙げられる。非特許文献 1 の方法では、溶媒耐性菌シュードモナス プチダ (Pseudomonas put ida) S12株にパントエア アグロメランス (Pantoea agg Lomerans) 由来のチロシン フエノール-リアーゼをコードするtpL遺伝子を導入した株、及びシュードモナス プチダS12株にシュードモナス プチダS12株由来のDAHPシンテターゼ (3-deoxy-D-arab ino-heptu Losonate 7-phosphate (DAHP) synthase) をコードするaroF-1 遺伝子を導入した株を作製して使用している。また、シュードモナス プチダS12株にシュードモナス プチダS12株由来のDAHPシンテターゼをコードするaroF-1 遺伝子を導入した株の中からフエニールァラニン及びタイロシンのアナログ (代謝拮抗物質) であるm-フルオロ-DL-フェニルァラニン (m-f Luoro-DL-pheny La Lan ine) に耐性な株を取得して使用している。さらに、この株の中からm-フルオロ-L-タイロシン (m-f Luoro-L-tyrosine) に耐性な株を取得して使用している。そして、これらの株を、ダルコ—スを唯一の炭素源とした好気的条件でのfed-batch culture に供してフエノ—ルを生産する技術を開示している。

しかし、非特許文献 1 の方法は、フエノールの生産性が実用上十分とはいない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1 :App U ed and Env i ronmenta L Mi crob i o Lo Logy, Vo L. 7 1, 2005, 8221 -8227.

発明の概要

発明が解決しょうとする課題

[0007] 本発明は、糖類を原料として効率よくフエノールを製造できる微生物、及びこの微生物を用いて糖類を原料として効率よくフエノールを製造できる方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するために本発明者らは研究を重ね、以下の知見を得た。

(i) コリネ型細菌はフエノールに対して高い耐性を有する。

(ii) コリネ型細菌にチロシン フエノール- リアーゼ遺伝子を導入した形質転換体は、効率よくフエノールを生産する。

(iii) この形質転換体において、宿主のコリネ型細菌の染色体上に存在するプレフエン酸デヒドラターゼ遺伝子及び/ 又はフエノール2- モノオキシゲナ—ゼ遺伝子が破壊又は欠損しているときは、一層効率よくフエノールを生産できる。

(iv) この形質転換体において、DAHPシンテターゼ遺伝子、及び/ 又はコリスミン酸ムターゼ遺伝子が、形質転換前の宿主の遺伝子発現レベルに比べて高発現しているときは、一層効率よくフエノールを生産できる。

(V) この形質転換体は、還元条件下の反応液中で実質的に増殖しない状態で反応させる場合、好気性の反応液中で増殖させつつ反応させる場合に比べて、フエノール生産効率が高い。

[0009] 本発明は上記知見に基づき完成されたものであり、以下の形質転換体及びフエノールの製造方法を提供する。

項1. チロシン フエノール- リアーゼ (tyros ine pheno L- Lyase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、フエノ

ール生産能を有する形質転換体。

項2. チロシン フエノール-リアーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が、パントエア アグロメランス (Pantoea agg Lomerans) 由来の遺伝子、シトロバクター ブラッキー (cit robacter braak ii) 由来の遺伝子、デスルフィトバクテリウム ハフニエンス (Desu Lf i tobacter i um hafn i ense) 由来の遺伝子、クロロフレクサス オウランティアカス (Ch Lorof Lexus aurant i acus) 由来の遺伝子、ノストック パンクチフオルメ (Nostoc punct i forme) 由来の遺伝子、又はトレポネマ デンティコラ (Treponema dent i co La) 由来の遺伝子である項1に記載の形質転換体。

項3. チロシン フエノール-リアーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が下記の(a)又は(b)のDNAである項1に記載の形質転換体。

(a) 配列番号36の塩基配列からなるDNA、配列番号39の塩基配列からなるDNA、配列番号42の塩基配列からなるDNA、配列番号45の塩基配列からなるDNA、配列番号48の塩基配列からなるDNA、又は配列番号51の塩基配列からなるDNA

(b) (a)の何れかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつチロシン フエノール-リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

項4. 宿主のコリネ型細菌が、その染色体上に存在する下記(c)及び/又は(d)の遺伝子が破壊され、又は欠損したものである、項1~3の何れかに記載の形質転換体。

(c) プレフェン酸デヒドラターゼ (prephenate dehydratase) 活性を有する酵素をコードする退伝子

(d) フエノール2-モノオキシゲナーゼ (pheno L 2-monooxygenase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子

項5. 宿主のコリネ型細菌の以下の(e)及び/又は(f)の代謝遺伝子が、宿主で高発現している項1~4の何れかに記載の形質転換体。

(e) DAHPシンテターセ (3-deoxy-D-arab i no-heptu Losonate 7-phosphate (DAHP) synthase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子

(f) コリスミン酸ムターゼ (chorismate mutase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子

項6. 宿主のコリネ型細菌がコリネバクテリウム ダルタミカムである項1〜5の何れかに記載の形質転換体。

項7. 宿主のコリネバクテリウム グルタミカムが、コリネバクテリウム グルミカムR (FERM P_ 18976)、ATCC 13032, 又はATCC1 3869である項6に記載の形質転換体。

項8. 宿主のコリネバクテリウム グルタミカムが、コリネバクテリウム グルミカムR (FERM P_ 18976)、ATCC 13032, 又はATCC1 3869の染色体上に存在する下記(c)及び/又は(d)の遺伝子が破壊され、又は欠損したものである、項6に記載の形質転換体。

(c) プレフェン酸デヒドラターゼ (prephenate dehydratase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子

(d) フエノール2-モノオキシゲナーゼ (phenoL 2-monooxygenase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子

項9. 宿主のコリネバクテリウム グルタミカムが、コリネバクテリウム グルミカムR (FERM P_ 18976)、ATCC 13032, 又はATCC1 3869において、以下の(e)及び/又は(f)の代謝遺伝子が高発現しているものである、項6又は8に記載の形質転換体。

(e) DAHPシンテターセ (3-deoxy-D-arabino-heptuLosonate 7-phosphate (DAHP) synthase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子

(f) コリスミン酸ムターゼ (chorismate mutase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子

項10. コリネバクテリウム ダルタミカム PHE7 (受託番号:NITE BP-976) 形質転換体。

項11. 項1〜10の何れかに記載の形質転換体を、還元条件下、糖類を含有する反応液中で反応させる工程と、反応液中のフエノールを回収する工程とを含むフェノールの製造方法。

項１２．　反応工程において、形質転換体が実質的に増殖しない項１１記載のフヱノールの製造方法。

項１３．　還元条件下の反応液の酸化還元電位が—２００～－５００ミリボルトである項１１又は１２に記載のフエノールの製造方法。

項１４．　糖類がグルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、ァラビノース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、トレハロース、及びマンニトールからなる群より選ばれるものである項１１～１３の何れかに記載のフエノールの製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明の形質転換体を用いることにより、従来公知の形質転換体に比べて、糖類からフエノールを高効率で製造することができる。

一般に微生物はフエノールのような溶剤の細胞毒性により生育が阻害されるため、微生物を用いてフエノールを製造することは困難であつたが、本発明方法によれば、微生物を用いて、実用上十分に効率良くフエノールを製造することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] 各種の微生物の好気条件下における増殖に及ぼすフエノールの影響を示す図である。

[図2] コリネバクテリゥムの還元条件下における糖消費に及ぼすフエノールの影響を示す図である。

[図3] 実施例で用いた各種プラスミドの構築図である。

[図4] 実施例で用いた各種プラスミドの構築図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

(I) フヱノール生産能を有する形質転換体

本発明のフエノール生産能を有する形質転換体は、チロシン フエノール-リアーゼ (tyros ine pheno L- Lyase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された形質転換体である。

[0013] 宿主

コリネ型細菌とは、バージーズ・マニュアル・デターミネィティブ・バクテリオロジー[Bargeys Manual of Determinative Bacteriology、Vol. 8、599(1974)]に定義されている一群の微生物であり、通常の好気的条件で増殖するものならば特に限定されるものではない。具体例を挙げれば、コリネバクテリウム属菌、ブレビバクテリウム属菌、アースロバクター属菌、マイコバクテリウム属菌、マイクロコッカス属菌等が挙げられる。コリネ型細菌の中ではコリネバクテリウム属菌が好ましい。

[0014] コリネバクテリウム属菌としては、コリネバクテリウム グルタミカム、コリネバクテリウム エフィシエンス(Corynebacterium efficiens)、コリネバクテリウム アンモニアゲネス(Corynebacterium ammoniagenes)、コリネバクテリウム ハロトレランス(Corynebacterium halotolerance)、コリネバクテリウム アルカノリティカム(Corynebacterium alkanolyticum)等が挙げられる。中でも、安全でかつフェノール生産性が高い点で、コリネバクテリウム グルタミカムが好ましい。好適な菌株として、コリネバクテリウム グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)R株(FERM P-18976)、ATCC13032株、ATCC13869株、ATCC13058株、ATCC13059株、ATCC13060株、ATCC13232株、ATCC13286株、ATCC13287株、ATCC13655株、ATCC13745株、ATCC13746株、ATCC13761株、ATCC14020株、ATCC31831株、MJ-233(FERM BP-1497)、MJ-233AB-41(FERM BP-1498)等が挙げられる。中でも、R株(FERM P-18976)、ATCC13032株、ATCC13869株が好ましい。

[0015] なお、分子生物学的分類により、ブレビバクテリウム フラバム(Brevibacterium flavum)、ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム(Brevibacterium lactofermentum)、ブレビバクテリウム ディバリカタム(Brevibacterium divaricatum)、コリネバクテリウム リリウム(Corynebacterium lilium)等のコリネ型細菌もコリネバクテリウム グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)に菌名が統一されている〔Liebl, W. et al., Transfer of Brevibacterium divaricatum DSM 20297T, "Brevibacterium flavum" DSM 20411,

"Brevibacterium Lactofermentum" DSM 20412 and DSM 1412, and Corynebacterium gLutamicum and their distinction by rRNA gene restriction patterns. Int J Syst BacterioL. 41:255-260. (1991)、駒形和男ら，コリネフォルム細菌の分類，発酵と工業，45: 944-963 (1987) 〕。

旧分類のプレビパクテリゥム ラクトフアーメンタムATCC13869 株、プレビバクテリゥム フラバムのMJ-233 株 (FERM BP-1497) 、MJ-233AB-41 株 (FERM BP-1498) なども好適なコリネバクテリゥム ダルタミカムである。

プレビバクテリウム属菌としては、プレビパクテリゥム アンモニアゲネス (Brevibacterium ammoniagenes) (例えばATCC6872 株) 等が挙げられる。

[0016] アースロバクター属菌としては、アースロバクター グロビフオルミス (Arthrobacter gLobiformis) (例えばATCC8010株、ATCC4336 株、ATCC21056 株、ATCC31250 株、ATCC31738 株、ATCC35698 株) 等が挙げられる。

マイコバクテリウム属菌としては、マイコバクテリゥム ボビス (Mycobacterium bovis) (例えばATCC19210株、ATCC27289 株) 等が挙げられる。

マイクロコッカス属菌としては、マイクロコッカス フロイデンライヒ (Micrococcus freudenreichii) (例えばNo. 239 株 (FERM P-13221)) 、マイクロコッカス ルテウス (Micrococcus Leuteus) (例えばNo. 240 株 (FERM P-13222))、マイクロコッカス ウレァエ (Micrococcus ureae) (例えばIAM1010株)、マイクロコッカス ロゼウス (Micrococcus roseus) (例えばIF03764 株) 等が挙げられる。

[0017] また、コリネ型細菌は、野生株の他に、その変異株や人為的な遺伝子組換え体であってもよい。例えば、ラクテート (乳酸) デヒドロゲナーゼ (Lactate dehydrogenase: LDH) 、フォスフオエノールピルベートカルボキシラーゼ (phosphoenoLpyrvate carboxylase) 、マレートデヒドロケナーセ (maLate dehydrogenase) などの遺伝子の破壊株が挙げられる。このような遺伝子破壊株を宿主として用いることにより、フエノールの生産性を向上させたり、副生成物の生成を抑制したりすることができる。

中でも、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株が好ましい。この遺

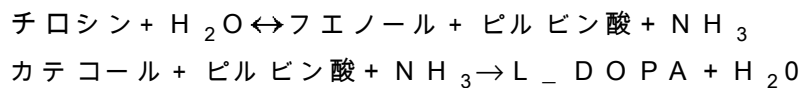
伝子破壊株は、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されていることにより、ピルビン酸から乳酸への代謝経路が遮断されている。中でも、コリネバクテリウム ダルタミカムの、特にR (FERM P-18976) 株のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株が好ましい。

このような遺伝子破壊株は、遺伝子工学的手法により常法に従い作製できる。例えば、WO2005/010182A1に、乳酸デヒドロゲナーゼ破壊株、及びその作製方法が記載されている。

[0018] チロシン_フエノール-リアーゼ酵素遺伝子(tpL)

チロシン フエノール-リアーゼ酵素は、下記の2反応を触媒する酵素である。

[化1]

チロシン+H_2O↔フエノール+ピルビン酸+NH_3
カテコール+ピルビン酸+NH_3→L_DOPA+H_20

チロシン フエノール-リァーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子の由来は特に限定されないが、パントエア アグロメランス (Pantoea agg Lomerans) 由来の遺伝子、シトロバクター プラッキー (citrobacter braakii) 由来の遺伝子、デスルフィトバクテリューム ハフニエンス (DesuLfitobacterium hafniense) 由来の遺伝子、クロロフレクサス オウランティアカス (ChLorofLexus aurantiacus) 由来の遺伝子、ノストック パンクチフオルメ (Nostoc punctiforme) 由来の這伝子、トレポネマ デンティコラ (Treponema denticoLa) 由来の遺伝子が好ましい。中でも、パントエア アグロメランス、シトロバクター プラッキー、又はデスルフィトバクテリューム ハフニエンス由来の遺伝子が好ましく、シトロバクター ブラッキー由来の遺伝子がより好ましい。

[0019] パントエア アグロメランス由来のチロシン フエノール-リアーゼ酵素遺伝子としては、配列番号36の塩基配列からなるDNAが挙げられ、シトロバクター プラッキー由来のチロシン フエノール-リアーゼ酵素遺伝子としては、配列番号39の塩基配列からなるDNAが挙げられ、デスルフィトバクテリューム ハ

フニエンス由来のチロシン フエノール-リアーゼ酵素遺伝子としては、配列番号42の塩基配列からなるDNAが挙げられ、クロロフレクサス オウランティァカス由来のチロシン フエノール-リアーゼ酵素遺伝子としては、配列番号45の塩基配列からなるDNAが挙げられ、ノストック パンクチフオルメ由来のチロシン フエノール-リアーゼ酵素遺伝子としては、配列番号48の塩基配列からなるDNAが挙げられ、トレポネマ デンティコラ由来のチロシン フエノール-リァ–ゼ酵素遺伝子としては、配列番号51の塩基配列からなるDNAが挙げられる。

[0020] また、本発明では、配列番号36、39、42、45、48、又は51の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつチロシン フエノール-リァーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

[0021] 本発明において「ストリンジェントな条件」は、一般的な条件、例えば、M0Lecu Lar CLoning, A Labo ratory Manua l, Second Ed it ion, 1989, Vo L2, p11.45に記載された条件を指す。具体的には、完全ハイブリッドの融解温度(Tm)より5~10℃低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合を指す。

チロシン フヱノール-リァーゼ活性は、後述する実施例3に記載の方法で測定できる。

また、本発明では、配列番号36、39、42、45、48、又は51の塩基配列と同—性が90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の塩基配列からなり、かつチロシン フエノール-リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

塩基配列の同一性は、GENETYX ver.8 (GENETYX 株式会社ゼネテイツクス製) により算出した値である。

[0022] 配列番号36、39、42、45、48、又は51の塩基配列からなるDNAのホモログは、例えば、これらの塩基配列に基づき常法に従い設計したプライマー又はプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションにより、他生物種のDNAライブラリーから選択することができ、これにより高確率でチロシン フエノール

-リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAが得られる。

[0023] 形質転換のためのベクターの構築

PCRで増幅したチロシン フエノール-リアーゼ酵素をコードするDNAは、宿主で増幅できる適切なベクターにクローニングすればよい。

プラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内で自律複製機能を司る遺伝子を含むものであれば良い。その具体例としては、プレビバクテリウム ラクトフアーメンタム (Brevibacterium Lactofermentum) 2256 由来のpAM330〔特開昭58-67699〕、〔Miwa, K. et al., Cryptic pLasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol. Chem. 48: 2901-2903 (1984)〕及び[Yamaguchi, R. et al., Determination of the complete nucleotide sequence of the Brevibacterium Lactofermentum pLasmid pAM330 and the anaLysis of its genetic information. NucLeic Acids Symp. Ser. 16:265-267 (1985)〕、コリネバクテリウム ダルタミカム ATCC13058 由来のpHM1519〔Miwa, K. et al., Cryptic pLasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol. Chem. 48: 2901-2903 (1984)〕及びpCRY30 [Kurusu, Y. et aL., Identification of pLasmid partition function in coryneform bacteria. AppL. Environ. Microbiol. 57:759-764 (1991)〕、コリネバクテリウム ダルタミカム T250 由来のpCG4 特開昭57-183799〕、[Katsumata, R. et aL., ProtopLast transformation of gLutamate-producing bacteria with pLasmid DNA. J. Bacteriol.、159:306-311 (1984)〕、pAG1、pAG3、pAG14、pAG50 特開昭62-166890〕、pEK0、pEC5、pEKExl〔Eikmanns, B.J. et aL., A famiLy of Corynebacterium gLutamicum/Escherichia coLi shuttLe vectors for cLoning, controlLed gene expression, and promoter probing. Gene, 102: 93-98 (1991)〕などが挙げられる。

[0024] 好ましいプロモーターとしては、コリネバクテリウム ダルタミカムR由来のダリセルアルデヒド3-フォスフエートデヒドロゲナーゼA遺伝子(gapA)のプロモーターPgapA、マレートデヒドロゲナーゼ遺伝子(mdh)のプロモーターPmdh、ラクテートデヒドロゲナーゼA遺伝子(LdhA)のプロモーターPLdhAなど

が挙げられ、中でも、PgapAが好ましい。

好ましいターミネーターとしては、大腸菌rRNAオペロンのrrnB T1T2 ターミネーター、大腸菌のtrpA ターミネーター、プレビバクテリゥム ラクトファーメンタム (Brevibacterium Lactofermentum) のtrp ターミ不ーターなごが挙げられ、中でも、rrnB T1T2 ターミネーターが好ましい。

[0025] 形質転換

形質転換方法は、公知の方法を制限無く使用できる。このような公知の方法として、例えば塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、リン酸カルシウム法、DEAE—デキストラン介在トランスフエクションヨン、電気穿孔法などが挙げられる。中でも、コリネ型細菌には、電気パルス法が好適であり、電気パルス法は、公知の方法 [Kurusu, Y. et aL., ELectroporation-transformation system for Corynef orm bacteria by auxotrophic compLementation. Agric. Bioし Chem. 54:443-447 (1990) 〕及び〔Vertes A.A. et aし, Presence of mrr- and mcr- Like restriction systems in Corynef orm bacteria. Res. Microbiol. 144: 181-185 (1993) 〕により行うことができる。

[0026] 形質転換体は、微生物の培養に通常使用される培地を用いて培養すればよし。この培地としては、通常、炭素源、窒素源、無機塩類及びその他の栄養物質等を含有する天然培地又は合成培地等を用いることができる。

炭素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、マンノース、マルトース、マンニトール、キシロース、ァラビノース、ガラクトース、澱粉、糖蜜、ソルビトール、グリセリン等の糖質又は糖アルコール ;酢酸、クエン酵、乳酸、フマル酸、マレイン酸又はダルコン酸等の有機酸 ;エタノール、プロパノール等のアルコール等が挙げられる。また、所望によりノルマルパラフィン等の炭化水素等も用いることができる。炭素源は、1種を単独で使用でき、又は2種以上を混合して使用してもよい。培地中のこれら炭素源の濃度は、通常、約0.1~10 (w/v%) とすればよい。

窒素源としては、塩化アンモニゥム、硫酸アンモニゥム、硝酸アンモニゥム、酢酸アンモニゥム等の無機又は有機アンモニゥム化合物、尿素、アンモ

ニア水、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等が挙げられる。また、コーンスティープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ—アミン、蛋白質加水分解物、アミノ酸等の含窒素有機化合物等も使用できる。窒素源は、1種を単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。培地中の窒素源濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常、約0.1~10 (w/v%) とすればよい。

無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト又は炭酸カルシウム等が挙げられる。これら無機塩は、1種を単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。培地中の無機塩類濃度は、使用する無機塩によっても異なるが、通常、約0.01~1 (w/v%) とすればよい。

栄養物質としては、例えば肉エキス、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンスティープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物、又は動植物若しくは微生物菌体のエキスやそれらの分解物等が挙げられる。栄養物質の培地濃度は、使用する栄養物質によっても異なるが、通常、約0.1~10 (w/v%) とすればよい。さらに、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、例えば、ビオチン、チアミン（ビタミンB1）、ピリドキシン (ビタミンB6) 、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

培地のpHは約5~8が好ましい。

[0027] 好ましい微生物培養培地としては、A培地〔Inui, M. et aL., Metabolic analysis of Corynebacterium gLutamicum during Lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. MoL Microbiol. Biotechnol. 7:182-196 (2004) 〕、BT培地 [Omumasaba, C.A. et aL, Corynebacterium gLutamicum gLyceraLdehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. J. MoL. Microbiol. BiotechnoL. 8:91-103 (2004) 〕等が挙げられる。

培養温度は約15～45℃とすればよく、培養時間は約1～7日間とすればよい。

[0028] 宿主染色体遺伝子の破壊又は欠失

宿主のコリネ型細菌は、その染色体上に存在するプレフェン酸デヒドラターゼ(prephenate dehydratase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子(pheA)、及び／又はフエノール2-モノオキシゲナーゼ (phenol 2-monooxygenase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子(poxF)が、破壊され、または欠失していることが好ましく、これにより一層効率良くフエノールを製造することができる。pheA及びpoxFが共に破壊され、または欠失していることがより好ましい。

遺伝子の部分配列を欠失し、正常に機能する酵素タンパク質を産生しないように改変した欠失型遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAで細菌を形質転換して、欠失型遺伝子と染色体上の遺伝子とで相同組換えを起こさせることにより、染色体上の遺伝子を欠失型又は破壊型の遺伝子に置換することができる。欠失型又は破壊型の遺伝子によってコードされる酵素タンパク質は、生成したとしても、野生型酵素タンパク質とは異なる立体構造を有し、機能が低下又は消失している。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子欠失又は破壊は既に確立しており、温度感受性複製起点を含むプラスミド、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で複製起点を持たないスィサイドベクターを利用する方法などがある(米国特許第6303383号、特開平05-007491号)。

具体的には、実施例2の項目に記載の方法により、プレフ｜ン酸デヒドラターゼ酵素遺伝子や、フエノール2-モノオキシゲナーゼ酵素遺伝子が破壊又は欠失したコリネ型細菌を得ることができる。

[0029] 代謝遺伝子の高発現

宿主のコリネ型細菌は、DAHPシンテターゼ (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase) 遺伝子 (aroG)、及び/又はコリスミン酸ムターゼ (chorismate mutase) 遺伝子 (csm) が、宿主の本来のレベル

、即ち野生型宿主のレベルより高発現していることが好ましい。この高発現は、形質転換による遺伝子導入、又は宿主染色体上の遺伝子のコピー数を高めることにより達成される。aroG及びcsmが共に高発現していることがより好ましい。

形質転換について述べれば、導入するDAHPシンテターゼ遺伝子及びコリスミン酸ムターゼ遺伝子は、宿主の遺伝子と同じ又は実質的に同じDAHPシンテターゼ遺伝子及びコリスミン酸ムターゼ遺伝子でもよく、その他のDAHPシンテターゼ遺伝子及びコリスミン酸ムターゼ遺伝子であってもよい。宿主の遺伝子と同じ又は実質的に同じ、DAHPシンテターゼ遺伝子及び/又はコリスミン酸ムターゼ遺伝子を導入する方が好ましい。

例えば、コリネバクテリウム ダルタミカム由来のDAHPシンテターゼ遺伝子としては、配列番号30の塩基配列からなるDNAが挙げられ、コリネバクテリウム ダルタミカム由来のコリスミン酸ムターゼ遺伝子としては、配列番号31の塩基配列からなるDNAが挙げられる。

その他のコリネ型細菌のDHAPシンターゼ遺伝子としては、コリネバクテリウム エフイシエンス(Corynebacterium efficiens)由来の遺伝子(配列番号62、日本DNAデータバンク:CE2073)、マイコバクテリウム スメグマティス(Mycobacterium smegmatis)由来の遺伝子(配列番号63、日本DNAデータバンク:MSMEG_4244)、ロドコッカス オパカス(Rhodococcus opacus)由来の遺伝子(配列番号64、日本DNAデータバンク:ROP_08400)などがあり、コリスミン酸ムターゼ遺伝子としては、コリネバクテリウム エフイシエンス由来の遺伝子(配列番号65、日本DNAデータバンク:CE0929)、マイコバクテリウム スメグマティス由来の遺伝子(配列番号66、日本DNAデータバンク:MSMEG_5536)、ロドコッカス オパカス由来の遺伝子(配列番号67、日本DNAデータバンク:R0P_56380)などがある。

また、DAHPシンテターゼ遺伝子又はコリスミン酸ムターゼ遺伝子について

実質的に同じ遺伝子」としては、当該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%

以上の同一性を有するポリペプチドであって、DAHPシンテターゼ活性又はコリスミン酸ムターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。また、DAHPシンテターゼ遺伝子又はコリスミン酸ムターゼ遺伝子について実質的に同じ遺伝子」としては、当該遺伝子と９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上の同一性を有するDNAであって、DAHPシンテターゼ活性又はコリスミン酸ムターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。

DAHPシンテターゼ活性の有無は、ホスホエノールピルビン酸とエリトロース-4-リン酸を基質として反応させ、生じた3-deoxy-D-arabino-heptuLosonate 7-phosphate (DAHP) を、チオバルビツール酸を用いた発色法により定量 (AppL. Environ. Microbioし, 74: 5497-5503 (2008).) することにより検出することができる。

また、コリスミン酸ムターゼ活性の有無は、コリスミ酸を基質として反応後、生じたプレフェン酸 (prephenate) を終濃度0.67N 塩酸によりフエニルピルビン酸 (phenyLpyruvate) に変換 (約10分インキュベート) し、その後320 nmの吸光度増加 (フエニルピルビン酸の生成) に基づき検出することができる (Microbiology., 155, 3382-3391 (2009).)。

[0030] 宿主染色体上のDAHPシンテターゼ遺伝子又はコリスミン酸ムターゼ遺伝子のコピー数を高める方法について述べれば、これらの遺伝子をコリネ型細菌の染色体DNA上に多コピー導入すればよい。微生物の染色体DNA上に遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して、相同組み換え法 (Experiments in MoLecuLar Genetics, CoLd Spring Harbor Lab. (1972)) により行うことができる。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。また、特開平2-109985 号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンと共に転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。さらに、Muファージを用いる方法 (特開平2-109985 号) で宿主染色体に目的遺伝子を組み込むこともできる。

[0031] また、コリネ型細菌の染色体上のDAHPシンテターゼ遺伝子及び/ 又はコリスミン酸ムターゼ遺伝子のプロモーター等の発現調節配列をより強力なものに置換することによつても、これらの遺伝子の発現を高めることができる。例えば、tac プロモーター、Lacプロモーター、trcプロモーター、trpプロモ—ター等が強力なプロモーターとして知られている。また、国際公開WO00/18935 に開示されているように、遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Go Ldste inらの論文（Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128）等に記載されている。発現調節配列の置換は、例えば、温度感受性ブラスミドを用いた遺伝子置換と同様にして行うことができる。

[0032] さらに、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）と開始コドンとの間のスペーサ、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することによって、翻訳量を向上させることもできる。

[0033] 上記のような遺伝子置換を行う方法としては、例えば、温度感受性複製起点を含むプラスミド、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で複製起点を持たないスィサイドベクターを利用する方法などがある（米国特許第6303383 号明細書、または特開平05-007491 号公報）。

[0034] （ＩＩ）フエノールの製造方法

上記説明した本発明の形質転換体を、還元条件下、糖類を含有する反応液中で反応させる工程と、反応液中のフエノールを回収する工程とを含む方法によりフエノールを製造することができる。

[0035] 微生物の増殖

反応に先立ち、形質転換体を好気条件下で、温度約２５～３８℃で、約１２～４８時間培養して増殖させることが好ましい。

[0036] 培善用培地

反応に先立つ形質転換体の好気的培養に用いる培地は、炭素源、窒素源、

無機塩類およびその他の栄養物質等を含有する天然培地または合成培地を用いることができる。

炭素源として、糖類 (グルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、ァラビノース、ガラクトースのような単糖 ;スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、キシロビオース、トレハロースのような二糖 ;澱粉のような多糖 ;糖蜜等)、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、グリセリンのような糖アルコール ;酢酸、クエン酵、乳酸、フマル酸、マレイン酸、ダルコン酸のような有機酸 ;エタノール、プロパノールのようなアルコール ;ノルマルパラフィンのような炭化水素等も用いることができる。

炭素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。

[0037] 窒素源としては、塩化アンモニゥム、硫酸アンモニゥム、硝酸アンモニゥム、酢酸アンモニゥムのような無機又は有機アンモニゥム化合物、尿素、ァンモニァ水、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等を使用できる。また、コーンスティープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ—ァミン、蛋白質加水分解物、アミノ酸等の含窒素有機化合物等も使用できる。窒素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。窒素源の培地中の濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常、約0.1~ 10 (w/ v%) とすればよい。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシゥム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、炭酸カルシウム等が挙げられる。無機塩は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。無機塩類の培地中の濃度は、使用する無機塩によっても異なるが、通常、約0.01~ 1 (w/ v%) とすればよい。

[0038] 栄養物質としては、肉エキス、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンスティープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物、動植物又は微生物菌体のエキスやそれらの分解物等が挙げられる。栄養物質の培地中の濃度は、使用する栄養物質によっても異なるが、通常約0.1~ 10 (w/ v%) とすればよい。

さらに、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、ビオチン、チアミン (ビタミンB1) 、ピリドキシン (ビタミンB6) 、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

培地のｐＨは約６～８が好ましい。

[0039] 具体的な好ましいコリネ型細菌用培地としては、A培地〔Inui, M. et aL., Metabolic analysis of Corynebacterium gLutamicum during Lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. MoL Microbiol. Biotechnol. 7:182-196 (2004)〕、BT培地 [Omumasaba, C.A. et aL, Corynebacterium gLutamicum gLyceraLdehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms With opposite, ATP-dependent reguLation. J. MoL. MicrobioL. BiotechnoL. 8:91-103 (2004)〕等が挙げられる。これらの培地において、糖類濃度を上記範囲にして用いればよい。

反応液

反応液としては、炭素源、窒素源、無機塩類およびその他の栄養物質等を含有する天然培地または合成培地を用いることができる。

炭素源としては糖類を用いる。糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、ァラビノース、ガラクトースのような単糖;スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、キシロビオース、トレハロースのような二糖;澱粉のような多糖;糖蜜等が挙げられる。中でも、単糖が好ましく、グルコースがより好ましい。

炭素源として、糖類の他に、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、グリセリンのような糖アルコール;酢酸、クエン酵、乳酸、フマル酸、マレイン酸、ダルコン酸のような有機酸;エタノール、プロパノールのようなアルコール;ノルマルパラフィンのような炭化水素等も用いることができる。

炭素源は、１種を単独で、又は２種以上を混合して使用できる。

反応液中の糖類の濃度は、約1~20 (w/v%) が好ましく、約2~10 (w/V%) がより好ましく、約2~5 (w/v%) がさらにより好ましい。

また、糖類を含む全炭素源の反応液中の濃度は、通常、約2~5 (w/ v %) とすればよい。

[0040] 窒素源としては、塩化アンモニゥム、硫酸アンモニゥム、硝酸アンモニゥム、酢酸アンモニゥムのような無機又は有機アンモニゥム化合物、尿素、アンモニァ水、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等を使用できる。また、コーンスティープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ—アミン、蛋白質加水分解物、アミノ酸等の含窒素有機化合物等も使用できる。窒素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。窒素源の反応液中の濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常、約0.1~ 10 (w/ v %) とすればよい。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシゥム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、炭酸カルシウム等が挙げられる。無機塩は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。無機塩類の反応液中の濃度は、使用する無機塩によっても異なるが、通常、約0.01~ 1 (w/ v %) とすればよい。

[0041] 栄養物質としては、肉エキス、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンスティープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物、動植物又は微生物菌体のエキスやそれらの分解物等が挙げられる。栄養物質の反応液中の濃度は、使用する栄養物質によっても異なるが、通常約0.1~ 10 (w/ v %) とすればよい。

さらに、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、ビオチン、チアミン (ビタミンB1) 、ピリドキシン (ビタミンB6) 、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

反応液のpHは約6~8が好ましい。

[0042] 具体的な好ましいコリネ型細菌用培地としては、前述したA培地、BT培地等が挙げられる。これらの培地において、糖類濃度を上記範囲にして用いればよい。

[0043] <u>反応条件</u>

反応温度、即ち形質転換体の生存温度は、約２０～５０℃が好ましく、約２５～４７℃がより好ましい。上記温度範囲であれば、効率良くフエノールを製造できる。

また、反応時間は、約1～7日間が好ましく、約1～3日間がより好ましい。

培養は、バッチ式、流加式、連続式の何れでもよい。中でも、バッチ式が好ましい。

反応は、好気的条件で行ってもよく、還元条件で行ってもよい。

[0044] <還元条件>

還元条件では、コリネ型細菌は実質的に増殖せず、一層効率的にフエノールを生産させることができる。

還元条件は、反応液の酸化還元電位で規定される。反応液の酸化還元電位は、約_２００ｍＶ～－５００ｍＶが好ましく、約_２５０ｍＶ～_５００ｍＶがより好ましい。

反応液の還元状態は簡便にはレサズリン指示薬（還元状態であれば、青色から無色への脱色）で推定できるが、正確には酸化還元電位差計（例えば、ＢＲＯＡＤＬＥＹ ＪＡＭＥＳ社製、ＯＲＰ Ｅｌｅｃｔｒｏｄｅｓ）を用いて測定できる。

[0045] 還元条件にある反応液の調整方法は、公知の方法を制限なく使用できる。例えば、反応液の液体媒体として、蒸留水などの代わりに反応液用水溶液を使用してもよく、反応液用水溶液の調整方法は、例えば硫酸還元微生物などの絶対嫌気性微生物用の培養液調整方法（Ｐｆｅｎｎｉｇ， Ｎ ｅｔ． ａｌ．（１９８１）：Ｔｈｅ ｄｉｓｓｉｍｉｌａｔｏｒｙ ｓｕｌｆａｔｅ―ｒｅｄｕｃｉｎｇ ｂａｃｔｅｒｉａ， Ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｒｏｋａｒｙｏｔｅｓ，Ａ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｎ Ｈａｂｉｔａｔｓ， Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂａｃｔｅｒ１ａ，Ｅｄ． ｂｙ Ｓｔａｒｒ， Ｍ． Ｐ． ｅｔ． ａに ｐ．９２６－９４０， Ｂｅｒｌｉｎ， Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ．）や

農芸化学実験書　第三巻、京都大学農学部　農芸化学教室編、１９９０年第２６刷、産業図書株式会社出版」などが参考となり、所望する還元条件下の水溶液を得ることができる。

具体的には、蒸留水などを加熱処理や減圧処理して溶解ガスを除去することにより、還元条件の反応液用水溶液を得ることができる。この場合、約１０ｍｍＨｇ以下、好ましくは約５ｍｍＨｇ以下、より好ましくは約３ｍｍＨｇ以下の減圧下で、約１～６０分程度、好ましくは約５～４０分程度、蒸留水などを処理することにより、溶解ガス、特に溶解酸素を除去して還元条件下の反応液用水溶液を作成することができる。

また、適当な還元剤（例えば、チオグリコール酸、ァスコルビン酸、システィン塩酸塩、メルカプト酢酸、チオール酢酸、ダルタチオン、硫化ソーダ等）を添加して還元条件の反応液用水溶液を調整することもできる。

これらの方法を適宜組み合わせることも有効な還元条件の反応液用水溶液の調整方法である。

[0046] 反応中も反応液を還元条件に維持することが好ましい。反応途中での還元条件を維持するために、反応系外からの酸素の混入を可能な限り防止することが望ましく、具体的には、反応系を窒素ガス等の不活性ガスや炭酸ガス等で封入する方法が挙げられる。酸素混入をより効果的に防止する方法としては、反応途中において本発明の好気性細菌の菌体内の代謝機能を効率よく機能させるために、反応系のｐＨ維持調整液の添加や各種栄養素溶解液を適宜添加する必要が生じる場合もあるが、このような場合には添加溶液から酸素を予め除去しておくことが有効である。

[0047] フエノールの回収

上記のようにして培養することにより、反応液中にフエノールが生産される。反応液を回収することによりフエノールを回収できるが、さらに、公知の方法でフエノールを反応液から分離することもできる。そのような公知の方法として、蒸留法、膜透過法、有機溶媒抽出法等が挙げられる。

実施例

[0048] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 フエノール生産用宿主としての適性試験：フエノールによるコリネバクテリウム グルタミカム及び他種菌体への影響

(1) フエノールによる好気増殖への影響

コリネバクテリゥム ダルタミカム、ェシエリヒア コリおよびシュードモナス プチダについて、好気培養におけるフエノールの生育阻害試験を行った。尚、本試験に用いたシュードモナス プチダS12は、溶媒耐性菌として報告されており、これまでに唯一フエノール生産の宿主として用いられた技術が開示されている。

コリネバクテリウム グルタミカムRをA寒天培地[$(NH_2)_2CO$ 2g、 $(NH_4)_2SO_4$ 7g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mL 0.02% (w/v) biotin solution 1 mL 0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、glucose 40 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに懸濁]に塗布し、33℃、15時間暗所に静置した。

上記のプレートで生育したコリネバクテリゥム ダルタミカムRを、A液体培地[$(NH_2)_2CO$ 2g、 $(NH_4)_2SO_4$ 7g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mL 0.02% (w/v) biotin solution 1 mL 0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、gLucose 40 gを蒸留水1Lに溶解] 10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて13時間、好気的に振盪培養を行った。

上記条件で生育したコリネバクテリゥム グルタミカムRを、A液体培地100mLに初期菌体濃度 OD_{610}=0.05となるように植菌し、同時にフエノールが終濃度0、0.16、0.2、0.24、0.32mMとなるように添加し、33℃にて好気的に振盪培養を行った。菌体の生育は OD_{610} の吸光度を測定することにより行った。

[0049] ェシエリヒア コリJM109をLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキ

ス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布し、37℃、15時間暗所に静置した。

上記プレートで生育したエシエリヒア コリJM109を、LB液体培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキスおよび0.5% 塩化ナトリウム〕10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、37℃にて13時間、好気的に振盪培養を行った。

上記条件で生育したエシエリヒア コリJM109をLB液体培地100mLに初期菌体濃度OD_{610}=0.05となるように植菌し、同時にフエノール濃度が終濃度0、0.16、0.20mMとなるように添加し、37℃にて好気的に振盪培養を行った。菌体の生育はOD_{610}の吸光度を測定することにより行った。

[0050] シュードモナス プチダF1およびS12をLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布し、30℃、15時間暗所に静置した。

上記プレートで生育したシュードモナス プチダF1およびS12を、LB (+ダルコース) 液体培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウムおよび0.4%グルコース〕10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、30℃にて13時間、好気的に振盪培養を行った。

上記条件で生育したシュードモナス プチダF1およびS12株をLB (+ダルコース) 液体培地100mLに初期菌体濃度OD_{610}=0.05となるように植菌し、同時にフエノール濃度が終濃度0、0.10、0.20mMとなるように添加し、30℃にて好気的に振盪培養を行った。菌体の生育はOD_{610}の吸光度を測定することにより行った。培地中へのフエノール添加による好気増殖への影響の解析結果を図1に示す。図1の縦軸はOD_{610}である。

[0051] エシエリヒア コリは、0.16%フエノール存在下で著しく増殖阻害を受け、0.20% フエノールでは完全に増殖が阻害された。

シュードモナス プチダF1及び溶剤耐性菌として報告されていたシュードモナス プチダS12は、ほぼ同じ傾向を示し、0.10%フエノール存在下で著しく増殖阻害を受け0.20% フエノールでは完全に増殖が阻害された。

これに対して、コリネバクテリゥム ダルタミカムは、エシエリヒア コリ

が顕著な増殖阻害を受けた0.16%のフエノール存在下においても増殖への影響はほとんどなく、エシエリヒア コリやシュードモナス プチダでは完全に増殖を阻害された0.20%のフエノール存在下においても良好な生育を示した。さらに0.24%のフエノール存在下において増殖が可能であつた。

このように、コリネバクテリウム ダルタミカムはエシエリヒア コリおよびシュードモナス プチダと比較して、フエノールに対し高い耐性を有し、フエノール生産の宿主として高い適性を有することが示された。

[0052] (2) フエノールによる還元条件下での糖代謝への影響

コリネバクテリウム ダルタミカムRを、A寒天培地に塗布し、33℃、20時間暗所に静置した。

上記のプレートで生育したコリネバクテリウム ダルタミカムRをA液体培地10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて15時間、好気的に振盪培養を行った。

上記条件で生育したコリネバクテリウム グルタミカムRをA液体培地500mLの入った容量2Lの三角フラスコに植菌し、33℃にて15時間、好気的に振盪培養を行った。

このようにして培養増殖した菌体は、遠心分離 (4℃、5,000 X g, 15分)により回収した。得られた菌体を、10 w/v% となるようにBT(-尿素)液体培地〔0.7% 硫酸アンモニウム、0.05% リン酸二水素カリウム、0.05% リン酸水素二カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム・7水和物、0.0006% 硫酸鉄・7水和物、0.00042% 硫酸マンガン水和物、0.00002% ビオチン、0.00002% チアミン塩酸塩〕に懸濁した。このそれぞれの菌体懸濁液60mLを容量100mLメディウム瓶に入れ、還元条件下 (酸化還元電位;-450 mV)、グルコースを8%、フエノール濃度を0、0.24、0.38、0.46mMとなるように添加し、33℃に保った水浴中で攪拌しながら反応させた。この時、反応液のpHが7.0を下回らないように2.5Nのアンモニア水を用いてpHコントローラー (エイブル株式会社製、型式:DT-1023) でコントロールしながら反応した。

[0053] コリネパクテリウム ダルタミカムRの還元条件下における糖代謝に及ぼす

フエノールの影響を検討した結果を図2に示す。

還元条件下においては、好気培養において増殖阻害が認められた0.24%フエノール存在下でも、フエノールによる影響は全く見られず、フエノール未添加と同等の糖消費を示した。

さらに、0.38%のフエノール存在下でも糖消費を認められ、0.46%のフエノール存在下においても僅かながら糖消費を示した。

このように、好気培養と比較して、還元条件ではフエノールに対して高い耐性を示し、還元条件下におけるコリネパクテリゥム ダルタミカムを宿主としたフエノール生産が、好気条件下における生産と比較して優位であることが示された。

[0054] ま施.例2 フエノール生まま伝子のクローニングとま現.

(1) 畠生物からのまめ本DNAの袖出

コリネバクテリゥム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R (FERM P-1 8976) からの染色体DNA抽出は、A培地 [$(NH_2)_2CO$ 2 g、$(NH_4)_2SO_4$ 7 g、KH_2PO_4 0.5 g、K_2HPO_4 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mL 0.02% (w/v) biotin solution 1 mL 0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 gを蒸留水1 Lに溶解] に、炭素源として、最終濃度4%になるように50% (w/v) グルコース溶液を添加し、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで33℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット (商品名:GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製) を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0055] パントエア アグロメランス (Pantoea agglomerans) NBRC 12686 からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No. 802 培地[polypeptone 10 g, yeast extract 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 gを蒸留水1 Lに溶解]に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで30℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0056] シトロバクター ブラッキー (citrobacter braakii) ATCC 6750 からの染色体DNA抽出は、Nutrient Broth (ベクトン.ディッキンソン社製 BD 234000) に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep CeLLs and Tissue DNA IsoLation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0057] デスルフィトバクテリューム ハフニエンス (DesuLfitobacterium hafniense) Y51 からの染色体DNA抽出は、MMYP培地[K_2HPO_4 7.8 g、KH_2PO_4 1.2 g、sodium citrate 0.5 g、$MgSO_4$-$7H_2O$ 0.1 g、yeast extract 2.0 g、sodium pyruvate 5.5 g、resazurin sodium salt 1.0 mgを蒸留水1 Lに溶解及びpH 7.2に調整]に、白金耳を用いて植菌後、嫌気培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep CeLLs and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0058] クロロフレクサス オウランティアカス (ChLoroflexus aurantiacus J-10-fL) ATCC 29366 からの染色体DNA抽出は、ChLoroflexus 培地[Nitrilotriacetic acid 0.1 g、Micronutrient Solution 1.0 mL、$FeCL_3$ Solution 1.0 mL、$CaSO_4$・$2H_2O$ 0.06 g、$MgSO_4$・$7H_2O$ 0.1 g、NaCL 0.008 g、KNO_3 0.103 g、$NaNO_3$ 0.689 g、Na_2HPO_4 0.111 g、NH_4CL 0.2 g、yeast extract 0.5 g、gLycyL-gLycine 0.5 gを蒸留水1 Lに溶解;Micronutrient Solution:H_2SO_4 0.5 mL、$MnSO_4$・$7H_2O$ 2.28 g、$ZnSO_4$・$7H_2O$ 0.5 g、H_3BO_3 0.5 g、$CuSO_4$・$2H_2O$ 0.025 g、Na_2MoO_4・$2H_2O$ 0.025 g、$CoCL_2$・$6H_2O$ 0.045 gを蒸留水1 Lに溶解、$FeCl_3$ SoLution:$FeCL_3$ 0.2905 gを蒸留水1 Lに溶解)]に、白金耳を用いて植菌後、タングステンランプ照射及び50℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep CeLLs and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0059] デスルフィトバクテリューム ハフニエンス (DesuLfitobacterium hafniense) Y51 からの染色体DNA抽出は、MMYP培地[K_2HPO_4 7.8 g、KH_2PO_4 1.2 g、so

dium citrate 0.5 g、$MgSO_4$-$7H_2O$ 0.1 g、yeast extract 2.0 g、sodium pyruvate 5.5 g、resazurin sodium salt 1.0 mgを蒸留水1 Lに溶解及びpH 7.2に調整]に、白金耳を用いて植菌後、嫌気培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep CeLLs and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0060] ノストック パンクチフオルメ (Nostoc punctiforme) ATCC 29133からの染色体DNA抽出は、BLue-green nitrogen-fixing培地[K_2HPO_4 0.04 g、$MgSO_4$-$7H_2O$ 0.075 g、$CaCL_2$・$2H_2O$ 0.036 g、Citric acid 6.0 mg、Ferric ammonium citrate 6.0 mg、EDTA 1.0 mg、Na_2CO_3 0.02 g、Trace MetaL Mix A5 1.0 mLを蒸留水1 Lに溶解及びpH 7.1に調整;Trace MetaL Mix A5:H_3BO_3 2.86 g、$MnCL_2$・$4H_2O$ 1.81 g、$ZnSO_4$・$7H_2O$ 0.222 g、Na_2MoO_4・$2H_2O$ 0.39 g、$CuSO_4$・$5H_2O$ 0.079 g、$Co(NO_3)_2$・$6H_2O$ 49.4mgを蒸留水1 Lに溶解]に、白金耳を用いて植菌後、光照射(2000~3000 Lux)及び26℃で培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep CeLLs and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

トレポネマ デンティコラ (Treponema denticoLa) JCM 8153の染色体DNA (Catalog No. RDB 6217)は独立行政法人 理化学研究所より入手した。

[0061] (2) クローニングベクターの構築

クローニングベクターpCRB22の構築

コリネバクテリウム カゼイ JCM 12072 由来のプラスミドpCASE1のDNA複製起点(以降、pCASE1-oriと記す)配列、及びクローニングベクターpHSG298(タカラバイオ株式会社製)をそれぞれ含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、pCASE1-ori配列、クローニングベクターpHSG298をそれぞれクローン化するべく、配列番号1(pCASE1-ori配列)、配列番号2(クローニングベクター pHSG298)を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し

、使用した。

[0062] pCASE1-or i配列増幅用プライマー

(a-1) ; 5' - AT AGATCT AGAACGTCCGTAGGAGC -3' (配列番号3)

(b-1) ; 5' - AT AGATCT GACTTGGTTACGATGGAC -3' (配列番号4)

尚、プライマー (a-1) 及び (b-1) には、Bg LII制限酵素部位が付加されている。

[0063] クローニングベクターpHSG298増幅用プライマー

(a-2) ; 5' - AT AGATCT AGGTTTCCCGACTGGAAAG -3' (配列番号5)

(b-2) ; 5' - AT AGATCT CGTGCCAGCTGCATTAATGA -3' (配列番号6)

尚、プライマー (a-2) 及び (b-2) には、Bg LII制限酵素部位が付加されている。

[0064] 鋳型DNAは、Japan. Co LLect ion of Mi croorgan isms (JCM)より入手したコリネバクテリウム カゼイ JCM1 2072から抽出したトータルDNA及びクローニングベクターPHSG298（タカラバイオ株式会社製）を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq（タカラバイオ株式会社製）を用いて下記の条件で行った。

[0065] 反応液：

TaKaRa LA Taq™ (5 un its/ パl)	0.5〃l
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5μl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mi xture (2. 5mM each)	8μl
鋳型 DNA	5μl (DNA含有量 1μg以下)
上記記載の2種プライマー*)	各々0.5μl (最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25. 5μ1

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) pCASE1-or i配列を増幅する場合はプライマー (a-1) と (b-1) の組み合わせ、クローニングベクターPHSG298を増幅する場合はプライマー (a-2) と (b-2) の組み合わせで行った。

[0066]

PGR サイクル ：

デナチユレーションン過程	：94℃	60秒
アニーリング過程	：52℃	60秒
エクステンション過程	：72℃	
	pCASE 1-ori 配列	150 秒
	クローニングベクターpHSG298	180 秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0067] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、pCASE 1-ori配列の場合約1.4-kb 、クローニングベクターpHSG298 の場合、約2.7-kb のDNA断片が検出できた。

上記のPCRにより増幅したコリネバクテリウム カゼィ株由来のプラスミドpCASE 1-ori配列含む約1.4-kb DNA断片10μL及びクローニングベクタ- pHSG298を含む約2.7-kb DNA断片10μlを各々制限酵素Bg LII で切断し、70℃ で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNA リガーゼ10Ｘ緩衝液 1μl 、T4 DNA リガーゼ (タカラバイオ株式会社製）1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μl にして、15℃ で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションA液とした。

得られたライゲーションA液を、塩化カルシウム法 (JournaL of MoLecuLar BioLogy, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/m Lを含むLB寒天培地 (1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素Bg LII でそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクターPHSG298 約2.7-kbのDNA断片に加え、pCASE-ori 配列の約1.4-kb DNA断片が認められた。

pCASE 1-ori配列を含むクローニングベクターをpCRB22 と命名した。

[0068] クローニングベクターPCRB11の構築

コリネバクテリウム グルタミカム内で複製可能なプラスミドPCG1 [(特開昭57—134500)] 由来のDNA複製起点 (以降、pCG1-oriと記す）配列、及びク

ローニングベクターpHSG398（タカラバイオ株式会社製）をそれぞれ含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、pCG1-ori配列、クローニングベクターpHSG398をそれぞれクローン化するべく、配列番号7（pCG1-ori配列）、配列番号8（クローニングベクターPHSG398）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

[0069] pCG1-ori配列増幅用プライマー

(a-3) ; 5' - AT AGATCT AGCATGGTCGTCACAGAG -3' (配列番号9)

(b-3) ; 5' - AT AGATCT GGAACCGTTATCTGCCTATG -3' (配列番号10)

尚、プライマー(a-3)及び(b-3)には、BglII制限酵素部位が付加されている。

[0070] クローニングベクターpHSG398増幅用プライマー

(a-4) ; 5' - AT AGATCT GTCGAACGGAAGATCACTTC -3' (配列番号11)

(b-4) ; 5' - AT AGATCT AGTTCCACTGAGCGTCAG -3' (配列番号12)

尚、プライマー(a-4)及び(b-4)には、BglII制限酵素部位が付加されている。

鋳型DNAは、pCG1［(特開昭57—134500)］及びクローニングベクターpHSG398（タカラバイオ株式会社製）を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq（タカラバイオ株式会社製）を用いて下記の条件で行った。

[0071] 反応液：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5μl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
鋳型DNA	5μl (DNA含有量 1μg以下)
上記記載の2種プライマーペ	各々0.5μl (最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) pCG1-ori配列を増幅する場合はプライマー(a-3)と(b-3)の組み合わせ、クローニングベクターPHSG398を増幅する場合はプライマー(a-4)と(b-4)の組み合わせで行った。

[0072] PCRサイクル:

デナチユレーション過程	:94℃	60秒
アニーリング過程	:52℃	60秒
エクステンション過程	:72℃	
pCG1_ori配列		120秒
クローニングベクターPHSG398		150秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0073] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、pCG1-ori配列の場合約1.9-kb、クローニングベクターpHSG398の場合、約2.2-kbのDNA断片が検出できた。

[0074] 上記のPCRにより増幅したプラスミドpCG1由来pCG1-ori遺伝子含む約1.9-kb DNA断片10μL及びクローニングベクターpHSG398を含む約2.2-kb DNA断片10μLを各々制限酵素BglIIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μL、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションB液とした。

得られたライゲーションB液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、クロラムフエニコール50μg/mLを含むLB寒天培地〔1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、および1.5%寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素BglIIでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクターPHSG398約2.2-kbのDNA断片に加え、pCG1-ori配列の約1.9-kb DNA断片が認められた。

pCG1-ori配列を含むクローニングベクターをpCRB11と命名した。

[0075] クローニングベクターpCRB15の構築

クローニングベクターPCRB1 1を含むDNA断片及びpSELECT-zeo-mcs （インビトロジェン株式会社製）由来のゼオシン耐性遺伝子をそれぞれ含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、クローニングベクターpCRB1 1及びゼオシン耐性遺伝子をそれぞれクローン化するべく、配列番号13 (pCRB1 1) 及び配列番号14 （ゼオシン耐性遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

[0076] クローニングベクターpCRB1 1配列増幅用プライマー

(a-5) ; 5' - AT GATATC CGAAGTGATCTTCCGTTCGA -3' （配列番号15）

(b-5) ; 5' - AT GATATC AAGGCAGTTATTGGTGCCCT -3' （配列番号16）

尚、プライマー (a-5) 及び (b-5) には、EcoRV制限酵素部位が付加されている。

[0077] ゼオシン耐性遺伝子増幅用プライマー

(a-6) ; 5' - AT GATATC TAGCTTATCCTCAGTCCTGC -3' （配列番号17）

(b-6) ; 5' - AT GATATC CCATCCACGCTGTTTTGACA -3' （配列番号18）

尚、プライマー (a-6) 及び (b-6) には、EcoRV制限酵素部位が付加されている。

[0078] 鋳型DNAは、クローニングベクターpCRB1 1及びpSELECT-zeo-mcs （インビトロジェン株式会社製）を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq （タカラバイオ株式会社製）を用いて下記の条件で行った。

[0079]

反応液 :

TaKaRa LA Taq ™ (5 unitsな l)	0.5μl
10X LA PGR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5μl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
鋳型DNA	5μl (DNA含有量1μg以下)
上記記載の2種プライマー*)	各々0.5μl (最終濃度1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) クローニングベクターpCRB11配列を増幅する場合はプライマー(a-5)と(b-5)の組み合わせ、ゼオシン耐性遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-6)と(b-6)の組み合わせで行った。

[0080] PCRサイクル :

デナチユレーション過程	:94°C	60秒
アニーリング過程	:52°C	60秒
エクステンション過程	:72°C	
	PCRB11配列	200秒
	ゼオシン耐性遺伝子	45秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0081] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、クローニングベクターpCRB11配列の場合約3.3-kb、ゼオシン耐性遺伝子の場合約0.5-kbのDNA断片が検出できた。

上記のPCRにより増幅したクローニングベクターpCRB11を含む約3.3-kb DNA断片10μL及びpSELECT-zeo-mcsプラスミド由来ゼオシン耐性遺伝子を含む約0.5-kb DNA断片10μlを各々制限酵素EcoRVで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10x緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションC液とした。

得られたライゲーションC液を、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970))によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、

ゼオシン25μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素EcoRVでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクターpCRB1 1由来約3.3-kb のDNA断片に加え、ゼオシン耐性遺伝子の場合、約0.5-kb DNA断片が認められた。

ゼオシン耐性遺伝子を含むクローニングベクターをpCRB1 5と命名した。

[0082] クローニングベクターpCRB207の構築

コリネバクテリゥム ダルタミカムR由来のダリセルアルデヒド3リン酸デヒドロケナーセ (g Lycera Ldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をコードするgapA遺伝子のプロモーター配列 (以降、PgapAと記す）を含むDNA断片、及びクローニングベクターPKK223-3 （フアルマシア社製）由来r rnBT1 T2双方向ターミネーター配列 (以降、ターミネーター配列と記す）を含むDNA断片を以下の方法により増幅した。

PCRに際して、PgapA配列及びターミネーター配列をそれぞれクローン化するべく、配列番号19 (PgapA配列）、配列番号20 （ターミネーター配列）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

[0083] PgapA配列増幅用プライマー

(a-7) ;5' - CTCT <u>GTCGAC</u> CCGAAGATCTGAAGATTCCTG -3' (配列番号21)

(b-7) ;5' - CTCT <u>GTCGAC</u> <u>GGATCC</u> <u>CCATGG</u> TGTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG -3' (配列番号22)

尚、プライマー (a-7) には、Sa LI制限酵素部位が、プライマー (b-7) には、Sa LI、BamHI及びNcoI制限酵素部位が付加されている。

[0084] ターミネーター配列増幅用プライマー

(a-8) ; 5' - CTCT <u>GCATGC</u> <u>CCATGG</u> CTGTTTTGGCGGATGAGAGA -3' (配列番号23)

(b-8) ; 5' - CTCT <u>GCATGC</u> <u>TCATGA</u> AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGG -3 (配列番号24)

尚、プライマー (a-8) には、SphI 及びNcoI 制限酵素部位が、プライマー (b-8) には、SphI 及びBspHI 制限酵素部位が付加されている。

[0085] 鋳型DNAは、コリネバクテリウム ダルタミカム R (FERM P-1 8976) から抽出した染色体DNA及びPKK223-3 プラスミド (フアルマシア社製) を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバィオ株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

[0086] 反応液:

TaKaRa LA Taq ™ (5 units/μl)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5がl
25mM $MgCl_2$	5がl
dNTP Mixture (2. 5mM each)	8バl
鋳型 DNA	5μl (DNA含有量 1μg以下)
上記記載の2種プライマーめ	各々0. 5μl (最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25. 5//l

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) PgapA 配列を増幅する場合はプライマー (a-7) と (b-7) の組み合わせ、タ—ミネーター配列を増幅する場合はプライマー (a-8) と (b-8) の組み合わせで行った。

[0087] PGR サイクル:

デナチユレーション過程	:94℃	60 秒
アニーリング過程	:52℃	60 秒
エクステンション過程	:72℃	
	PgapA 配列	45 秒
	ターミネーター配列	30 秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0088] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、PgapA 配列の場合約0. 6-kb 、ターミネーター配列の場合、約0. 4-kb のDNA断片が検出できた。

上記のPCRにより増幅したコリネバクテリウム ダルタミカム R由来PgapA 配列を含む約0. 6-kb DNA断片10μlとクローニングベクターpCRB22約4. 1-kb を各

々制限酵素SaLIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションD液とした。

得られたライゲーションD液を、塩化カルシウム法〔JournaL of MoLecuLar BioLogy, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素SaLIでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクターpCRB22約4.1-kbのDNA断片に加え、PgapA配列)の約0.6-kb DNA断片が認められた。

PgapA配列を含むクローニングベクターをpCRB206と命名した。

[0089] 上記PCRにより増幅したPKK223-3プラスミド由来ターミネーター配列を含む約0.4-kb DNA断片10μlを制限酵素NcoI及びBspHIで、上述のクローニングベクターPCRB206 2μLを制限酵素NcoIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションE液とした。

得られたライゲーションE液を、塩化カルシウム法〔JournaL of MoLecuLar BioLogy, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクターPCRB206約4.7-kbのDNA断片に加え、ターミネーター配列の

約0.4-kb DNA断片が認められた。

rrnBT1 T2ターミネーター配列を含むクローニングベクターをpCRB207と命名した。

[0090] クローニングベクターPCRB209の構築

コリネバクテリウム グルタミカムR由来のgapA (g Lycera Ldehyde 3-phosphate dehydrogenase A) 遺伝子のプロモーター (以降、PgapAと記す) 配列を含むDNA断片を以下の方法により増幅した。

PCRに際して、pCRB207配列をクローン化するべく、配列番号25 (pCRB207) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

[0091] PCRB207配列増幅用プライマー

(a-9) ; 5' - CTCT CATATG CTGTTTTGGCGGATGAGAG -3' (配列番号26)

(b-9) ; 5' - CTCT CATATG GTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG -3' (配列番号27)

尚、プライマー (a-9) 及び (b-9) にはNdeI制限酵素部位が付加されている。

[0092] 鋳型DNAは、gapAプロモーター及びrrnBT1 T2ターミネーター配列を含有するクローニングベクターPCRB207を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (宝酒造株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

[0093] 反応液:

TaKaRa LA Taq ™ (5 unitsな l)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5バl
25mM $MgCl_2$	5バl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
鋳型DNA	5μl (DNA含有量 1μg以下)
上記記載の2種プライマー*)	各々0.5お1 (最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5//l

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) PCRB207配列を増幅する場合はプライマー (a-9) と (b-9) の組み合わせで行った。

[0094] PCRサイクル：

デナチユレーション過程	：94°C	60秒
アニーリング過程	：52°C	60秒
エクステンション過程	：72°C	307秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0095] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、クローニングベクターpCRB207配列を含む約5.1-kbのDNA断片が検出できた。

[0096] 上記のPCRにより増幅したpCRB207由来遺伝子を含む約5.1-kb DNA断片10μLを制限酵素NdeIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ（宝酒造株式会社製）1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションF液とした。

得られたライゲーションF液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、および1.5%寒天〕に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素NdeIで切断し、制限酵素サイトの挿入を確認した。

PgapA配列及びrrnBT1T2ターミネーター配列を含むクローニングベクターをPCRB209と命名した。

[0097] クローニングベクターpCRB210の構築

コリネバクテリウム グルタミカムR由来のgapA（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A）遺伝子のプロモーター（以降、PgapAと記す）配列を含むDNA断片を以下の方法により増幅した。

PCRに際して、pCRB207配列をクローン化するべく、配列番号25（pCRB207）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

[0098] PCRB207配列増幅用プライマー

(a-10) ; 5' - CTCT GATATC CTGTTTTGGCGGATGAGAGA -3' (配列番号28)

(b-10) ; 5' - CTCT GATATC TCTCCTCTAAAGATTGTAGGAAATG -3'

(配列番号29)

尚、プライマー (a-10) 及び (b-10) にはEcoRV制限酵素部位が付加されている。

鋳型DNAは、gapA プロモーター及びrrnBT1 T2ターミネーター配列を含有するクローニングベクターPCRB207を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (宝酒造株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

[0099] 反応液 :

TaKaRa LA Taq™ (5 unitsな l)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5μl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
鋳型 DNA	5μl (DNA含有量 1μg以下)
上記記載の 2 種プライマー*)	各々0.5μl (最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。 *) pCRB207配列を増幅する場合はプライマー (a-10) と (b-10) の組み合わせで行った。

[0100] PCRサイクル :

デナチユレーション過程	:94°C	60 秒
アニーリング過程	:52°C	60 秒
エクステンション過程	:72°C	307 秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

上記で生成した反応液10μLを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、クローニングベクターpCRB207配列を含む約5.1-kb のDNA断片が検出できた。

[0101] 上記のPCRにより増幅したpCRB207由来遺伝子を含む約5.1-kb DNA断片10μlを制限酵素EcoRVで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ (宝

酒造株式会社製）1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションG液とした。

得られたライゲーションG液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素EcoRVで切断し、制限酵素サイトの挿入を確認した。

PgapA配列及びrrnBT1T2ターミネーター配列を含むクローニングベクターをPCRB210と命名した。

[0102] (3) フエノール生産遺伝子のクローニング

コリネバクテリウム グルタミカム由来のフエノール生産遺伝子のクローニング

コリネバクテリウム グルタミカム由来のDAHPシンテターゼをコードするaroG遺伝子、コリスミ酸ムターゼをコードするcsm遺伝子をそれぞれ含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、aroG遺伝子及びcsm遺伝子をそれぞれクローン化するべく、配列番号30（コリネバクテリウム グルタミカムaroG遺伝子）及び配列番号31（コリネバクテリウム グルタミカムcsm遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社製「394 DNA/RNA シンセサイザー（synthesizer）」を用いて合成し、使用した。

[0103] aroG遺伝子増幅用プライマー

(a-11) ; 5'-CTCT CATATG AATAGGGGTGTGAGTTGG-3' (配列番号32)

(b-11) ; 5'-CTCT CATATG TTAATTACGCAGCATTTCTGCAACG-3' (配列番号33)

尚、プライマー（a-11）及び（b-11）には、Nde I制限酵素部位が付加され

ている。

csm遺伝子増幅用プライマー

(a-12) ; 5' - CTCT CATATG ACTAATGCAGGTGACAACTTC -3' (配列番号34)

(b-12) ; 5' - CTCT CATATG TTATCCGAGCTTTCCGCG -3' (配列番号35)

尚、プライマー (a-12) 及び (b-12) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

[0104] パントエア アグロメランス由来のフエノール生産遺伝子のクローニング

パントエア アグロメランス由来のチロシン フエノール-リアーゼ活性を有する遺伝子をコードするtpL遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、tpL遺伝子をクローン化するべく、配列番号36（パントエア アグロメランスtpL遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0105] tpL遺伝子増幅用プライマー

(a-13) ; 5' - CTCT CATATG AACTATCCTGCCGAGC -3' (配列番号37)

(b-13) ; 5' - CTCT CATATG TTAAATAAAGTCAAAACGCGCAGTAAAG -3' (配列番号38)

尚、プライマー (a-13) 及び (b-13) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

[0106] シトロバクター プラッキー由来のフエノール生産遺伝子のクローニング

シトロバクター プラッキー由来のチロシン フエノール-リアーゼ活性を有する遺伝子をコードするtpL遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。 PCRに際して、tpL遺伝子をクローン化するべく、配列番号39（シトロバクター プラッキー tpL遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0107] tpL遺伝子増幅用プライマー

(a-14) ; 5' - CTCT TCATGA ATTATCCGGCAGAACCC -3' (配列番号40)

(b-14) ; 5' - CTCT TCATGA TTAGATATAGTCAAAGCGTGCAG -3'

(配列番号41)

尚、プライマー(a-14)及び(b-14)には、BspHI制限酵素部位が付加されている。

[0108] デスルフィトバクテリューム ハフニエンス由来のフエノール生産遺伝子のクローニング

デスルフィトバクテリューム ハフニエンス由来のチロシン フエノール-リアーゼ活性を有する遺伝子をコードするtpL遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、tpL遺伝子をクローン化するべく、配列番号42（デスルフィトバクテリューム ハフニエンス tpL遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製「394 DNA/RNAシンセサイザー(synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0109] tpL遺伝子増幅用プライマー

(a-15) ; 5' - CTCT GATATC ATGAAAACCTATCCTGCAGAACC -3'

(配列番号43)

(b-15) ; 5' - CTCT GATATC TCAAATGTGTTCAAATCTGGCGG -3'

(配列番号44)

尚、プライマー(a-15)及び(b-15)には、EcoRV制限酵素部位が付加されている。

[0110] クロロフレクサス オウランティアカス由来のフエノール生産遺伝子のクローニング

クロロフレクサス オウランティアカス由来のチロシン フエノール-リアーゼ活性を有する遺伝子をコードするtpL遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、tpL遺伝子をクローン化するべく、配列番号45（クロロフレ

クサス オウランティアカスtpL遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社製「394 DNA/RNAシンセサイザー（synthesizer）」を用いて合成し、使用した。

tpL遺伝子増幅用プライマー

(a-16) ; 5' - CTCT CATATG CAGGAACAAGACTACCC -3' (配列番号46)

(b-16) ; 5' - CTCT CATATG TCATTCCACCGGTTCAAACC -3' (配列番号47)

尚、プライマー（a-16）及び（b-16）には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

[0111] ノストック パンクチフオルメ由来のフエノール生産遺伝子のクローニング

ノストック パンクチフオルメ由来のチロシン フエノール-リアーゼ活性を有する遺伝子をコードするtpL遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、tpL遺伝子をクローン化するべく、配列番号48（ノストック パンクチフォルメtpL遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社製「394 DNA/RNAシンセサイザー（synthesizer）」を用いて合成し、使用した。

[0112] tpL遺伝子増幅用プライマー

(a-17) ; 5' - CTCT CATATG ACCGATGCCAAGCAAAC -3' (配列番号49)

(b-17) ; 5' - CTCT CATATG TTACTGCAATTCAAATCTTGCTTGAAAG -3'

(配列番号50)

尚、プライマー（a-17）及び（b-17）には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

[0113] トレポネマ デンティコラ由来のフエノール生産遺伝子のクローニング

トレポネマ デンティコラ由来のチロシン フエノール-リアーゼ活性を有する遺伝子をコードするtpL遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、tpL遺伝子をクローン化するべく、配列番号51（トレポネマ デンティコラtpL遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプ

ライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNA シンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0114] t_pL遺伝子増幅用プライマー

(a-18) ; 5'-CTCT CATATG GATATTAAAAATTATCCTGCGGAAC -3'

(配列番号52)

(b-18) ; 5'-CTCT CATATG TTAGATATGCTCAAAGCGTGCC -3'

(配列番号53)

尚、プライマー (a-18) 及び (b-18) には、Nde I制限酵素部位が付加されている。

[0115] 鋳型DNAは、コリネバクテリウム ダルタミカムは、コリネバクテリウム グルタミカムRから抽出した染色体DNAを用いた。パントエア アグロメランスは、NITE Biological Resource Center (NBRC) より入手したパントエア アグロメランスNBRC 12686から抽出した染色体DNAを用いた。シトロバクター プラッキーは、American Type Culture Collection (ATCC) より入手したシトロバクター プラッキーATCC 6750から抽出した染色体DNAを用いた。デスルフィトバクテリューム ハフニエンスは、デスルフィトバクテリューム ハフニエンス Y51から抽出した染色体DNAを用いた。クロロフレクサス オウランティアカスは、American Type Culture Collection (ATCC) より入手したクロロフレクサス オウランティアカス J-10-fl ATCC 29366から抽出した染色体DNAを用いた。ノストック パンクチフオルメは、American Type Culture Collection (ATCC) より入手したノストック パンクチフオルメ ATCC 29133から抽出した染色体DNAを用いた。トレポネマ デンティコラは、Japan Collection of Microorganisms (JCM) より入手したトレポネマ デンティコラ染色体DNA (catalog No. RDB 6217) を用いた。

[0116] 実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバイオ株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

反応液：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/ /ℓ l)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5バl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mixture (2. 5mM each)	8バl
銕型 DNA	5〃l (DNA含有量1μg以下)
上記記載の2種プライマー*)	各々0.5お1 (最終濃度1μM)
滅菌蒸留水	25. 5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) コリネパクテリゥム ダルタミカムaroG遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-11)と(b-11)の組み合わせ、コリネバクテリゥム ダルタミカムcsm遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-12)と(b-12)、パントエア ァグロメランス tpL遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-13)と(b-13)の組み合わせ、シトロバクター プラッキーtpL遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-14)と(b-14)の組み合わせ、デスルフィトバクテリューム ハフニエンスtpL遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-15)と(b-15)の組み合わせ、クロロフレクサス オウランティアカスtpL遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-16)と(b-16)の組み合わせ、ノストック パンクチフオルメ tpL遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-17)と(b-17)の組み合わせ、トレポネマ デンティコラ tpL遺伝子を増幅する場合はプライマー(a-18)と(b-18)の組み合わせで行った。

[0117] PGRサイクル：

デナチユレーション過程	:94℃	60秒
ァニーリング過程	:52℃	60秒
エクステンション過程	:72℃	
コリネバクテリウム グルタミカム aroG 遺伝子		84秒
コリネバクテリウム グルタミカム csm 遺伝子		18秒
パントエア アグロメランス tpl 遺伝子		82秒
シトロパクター ブラツキー tpl 遺伝子		82秒
デスルフイトバクテリューム ハフニエンス tpl 遺伝子		82秒
クロロフレクサス ォウランティアカス tpl 遺伝子		85秒
ノストック パンクチフオルメ tpl 遺伝子		84秒
トレポネマ デンティコラ tpl 遺伝子		83秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0118] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、コリネバクテリウム ダルタミカムaroG遺伝子の場合約1.4-kb、コリネバクテリウム ダルタミカムcsm遺伝子の場合約0.3-kb、パントエア アグロメランス tpL遺伝子の場合約1.4-kb、シトロバクター プラッキーtpL遺伝子の場合約1.4-kb、デスルフイトバクテリューム ハフニエンスtpL遺伝子の場合約1.4-kb、クロロフレクサス オウランティアカスtpL遺伝子の場合約1.4-kb、ノストツク パンクチフオルメ tpL遺伝子の場合約1.4-kb、トレポネマ デンティコラ tpL遺伝子の場合約1.4-kbのDNA断片が検出できた。

[0119] (4) フエノール生産遺伝子発現プラスミドの構築

フエノール生産遺伝子のpCRB207へのクローニング

上記項(3)に示したPCRにより増幅したシトロバクター プラッキー株由来 tpL遺伝子を含む約1.4-kb DNA断片10μLを制限酵素BspHIで、PgapAプロモーターを含有するクローニングベクターpCRB207 2μlを制限酵素NcoIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ(タカラバイオ株式会社製) 1unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションH液とした。

得られたライゲーションH液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、および1.5%寒天〕に塗布した。

各々培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpCRB207約5.1-kbのDNA断片に加え、シトロバクター ブラツキー株由来tpL遺伝子(ライゲーションH液)の場合、長さ約1.4-kbの挿入断片が認められた。

シトロバクター プラッキー株由来tpL遺伝子を含むプラスミドをpCRB207-t

pL/CBと命名した（図3）。

[0120] フエノール生産遺伝子のpCRB209へのクローニング

上記項(3)に示したPCRにより増幅したコリネバクテリウム ダルタミカム株由来aroG遺伝子を含む約1.4-kb DNA断片、コリネバクテリウム ダルタミカム株由来csm遺伝子を含む約0.3-kb DNA断片、パントエア アグロメランス株由来tpL遺伝子を含む約1.4-kb DNA断片、クロロフレクサス オウランティアカス株由来tpL遺伝子を含む約1.4-kb DNA断片、ノストック パンクチフォルメ株由来tpL遺伝子を含む約1.4-kb DNA断片及びトレポネマ デンティコラ株由来tpL遺伝子を含む約1.4-kb DNA断片 10μl及びPgapAプロモーターを含有するクローニングベクターpCRB209 2μLを各々制限酵素NdeIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ（タカラバイオ株式会社製）1unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションI液、J液、K液、L液、M液及びN液とした。

[0121] 得られた6種のライゲーションI液、J液、K液、L液、M液及びN液それぞれを、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

各々培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpCRB209約5.1-kbのDNA断片に加え、コリネバクテリウム ダルタミカム株由来aroG遺伝子（ライゲーションI液）の場合、長さ約1.4-kbの挿入断片が、コリネバクテリウム ダルタミカム株由来csm遺伝子（ライゲーションJ液）の場合、長さ約0.3-kbの挿入断片が、パントエア アグロメランス株由来tpL遺伝子（ライゲーションK液）の場合、長さ約1.4-kbの挿入断片が、クロロフレクサス オウランティアカス株由来tpL遺伝子（ライゲーシ

ヨンL液）の場合、長さ約1.4-kb の挿入断片が、ノストック パンクチフォルメ株由来tpL遺伝子 (ライゲーションM液）の場合、長さ約1.4-kb の挿入断片が、トレポネマ デンティコラ株由来 tpL遺伝子 (ライゲーションN液）の場合、長さ約1.4-kb の挿入断片が認められた。

[0122] コリネバクテリゥム グルタミカム株由来aroG遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-aroG/CG、コリネバクテリゥム グルタミカム株由来csm遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-csm/CG 、パントエア アグロメランス株由来tpL遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-tpL/PA、クロロフレクサス オウランティアカス株由来tpL遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-tpL/CA、ノストック パンクチフォルメ株由来tpL遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-tpL/NP、トレポネマ デンティコラ株由来 tpL遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-tpL/TD とそれぞれ命名した (図3）。

[0123] <u>フエノール生産遺伝子のDCRB210へのクローニング</u>

上記項(3) に示したPCRにより増幅したデスルフィトバクテリューム ハフニエンス株由来tpL遺伝子を含む約1.4-kb DNA断片10μl及びPgapA プロモーターを含有するクローニングベクターPCRB210 2μlを各々制限酵素EcoRV で切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNA リガーゼ10X 緩衝液 1μl、T4 DNA リガーゼ (タカラバイオ株式会社製） 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μl にして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーション0液とした。

得られたライゲーション0液を、塩化カルシウム法 〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地 〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

各々培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドPCRB210約5.1-kb のDNA断片に加え、デスルフイトバクテリューム ハフニエンス株由来tpL遺伝子 (ライゲーション0液）の場合、長さ

約1.4-kb の挿入断片が認められた。

デスルフィトバクテリューム ハフニエンス株由来tpL遺伝子を含むプラスミドをpCRB2 10-tpL/DH と命名した (図3)。

[0124] フエノール生産遺伝子のpCRB1へのクローニング

上述のプラスミドpCRB209-aroG/CG を制限酵素BamHIで切断し、アガロース電気泳動後、アガロースゲルからQIAquick GeL Extraction Kit (株式会社キアゲン社製)によって回収したgapA プロモーターとコリネバクテリウム ダルタミカム株由来aroG遺伝子及びターミネーター配列を連結した約2.4-kb のDNA断片とBamHIで切断したクローニングベクターpCRB1 [Nakata, K. et aL., Vectors for the genetics engineering of corynebacteria; in Saha, B.C. (ed.) :Fermentation Biotechnology, ACS Symposium Series 862. Washington, American Chemical Society : 175-191 (2003)〕約4.1-kb を70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させたDNA断片を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNA リガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μl にして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションP液とした。

得られたライゲーションP液を用い、塩化カルシウム法 〔Journal of MoLecuLar BioLogy, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、クロラムフエニコール50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素BamHIで切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpCRB1約4.1-kb のDNA断片に加え、コリネパクテリゥム グルタミカム株由来aroG遺伝子 (ライゲーションP液)の場合、長さ約2.4-kb の挿入断片が認められた。

コリネバクテリゥム ダルタミカム株由来aroG遺伝子を含むプラスミドをpCRB1-aroG/CG と命名した (図4)。

[0125] フエノール生産遺伝子のDCRB15へのクローニング

上述のプラスミドpCRB209-csm/CG を制限酵素BamHIで切断し、アガロース電気泳動後、アガロースゲルからQIAquick Gel Extraction Kit (株式会社キアゲン社製)によって回収したgapA プロモーターとコリネバクテリウム グルタミカム株由来csm 遺伝子及びターミネーター配列を連結した約1.3-kb のDNA 断片とBamHIで切断した上述のプラスミドpCRB 15約3.8-kb を70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させたDNA 断片を混合し、これにT4 DNA リガーゼ10X 緩衝液 1μl、T4 DNA リガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μl にして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションQ液とした。

得られたライゲーションQ液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)) によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、ゼオシン 25μg/mL を含むLB寒天培地 (1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天) に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNA を抽出、該プラスミドを制限酵素BamHIで切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpCRB 15約3.8-kbのDNA断片に加え、コリネバクテリウム グルタミカム株由来csm 遺伝子 (ライゲーションQ液) の場合、長さ約1.3-kb の挿入断片が認められた。

コリネバクテリウム グルタミカム株由来csm 遺伝子を含むプラスミドをpCRB15-csm/CG と命名した (図4)。

[0126] (5) コリネバクテリウム グルタミカムの染色体遺伝子破壊用プラスミドの構築

コリネバクテリウム グルタミカム株pheA 遺伝子破壊用プラスミドの構築

コリネバクテリウム グルタミカム株の染色体上pheA 遺伝子のマーカーレス破壊用プラスミドを構築するために必要なDNA 断片を以下のPCR 法により増幅した。

PCR に際してコリネバクテリウム グルタミカム Rの配列を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosy

stems) 社製「394 DNA/RNA シンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0127] pheA-1領域増幅用プライマー

(a-19) ; 5'-CTCT CTGCAG TGAAGTGCGTGTAAACGCAC-3' (配列番号54)

(b-19) ; 5'-GCTTAGCTAGTTGGTCGGTTGCAATGATTTGCACGTTGGAG-3' (配列番号55)

尚、プライマー(a-19)には、PstI制限酵素部位が付加されている。

[0128] pheA-2 領域増幅用プライマー

(a-20) ; 5'-AACCGACCAACTAGCTAAGC-3' (配列番号56)

(b-20) ; 5'-CTCT TCTAGA AATTACTCCTGCCATGGCAG-3' (配列番号57)

尚、プライマー(b-20)には、XbaI 制限酵素部位が付加されている。

[0129] 鋳型DNAは、コリネバクテリウム グルタミカムRから抽出した染色体DNAを用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバイオ株式会社製)を用いて下記の条件で行った。

[0130] 反応液:

TaKaRa LA Taq™ (5 unitsな l)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5バl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
鋳型 DNA	5μl (DNA 含有量 1μg 以下)
上記記載の2種プライマーぺ	各々0.5μl (最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) pheA-1領域を増幅する場合はプライマー(a-19)と(b-19)の組み合わせ、pheA-2 領域を増幅する場合はプライマー(a-20)と(b-20)で行った。

[0131]

PCR サイクル ：
デナチユレーションョン過程 :94。c
ァニーリング過程 :52。c
エクステンション過程 :72°C
PheA-1 領域 50 秒
PheA-2 領域 50 秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0132] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、コリネバクテリゥム ダルタミカムコリpheA-1領域の場合約0.9-kb 、pheA-2 領域の場合約0.8-kb のDNA断片が検出できた。

[0133] 次に、上記のPCRにより増幅したpheA-1領域断片とpheA-2 領域断片を1μlずつ混合し、PCRにより2種の断片の結合反応を行った。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700（アプライド・バイオシステムズ社製）を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq （タカラバィオ株式会社製）を用いて下記の条件で行った。

反応液 ：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg2+ free)	5μl
25mM MgCl2	5μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
上記記載の2種断片*	各々1μl
滅菌蒸留水	29.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*）pheA-1領域断片 と pheA-2 領域断片で行った。

[0134] PCR サイクル ：
デナチユレーションョン過程 ：95°C 20 秒
ァニーリング過程 ：52°C 5 秒
エクステンション過程 ：72°C 50 秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0135] さらに、得られたpheA-1及びpheA-2の結合断片を鋳型とし、PCRによりpheA欠失断片の増幅を行った。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバイオ株式会社製)を用いて下記の条件で行った。

反応液：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5μl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
鋳型DNA	5μl (DNA含有量1μg以下)
上記記載の2種プライマー*)	各々0.5μl (最終濃度1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) pheA欠失断片を増幅する場合はプライマー(a-19)と(b-20)の組み合わせで行った。

[0136] PCRサイクル：

デナチユレーション過程	：95℃	20秒
アニーリング過程	：52℃	5秒
エクステンション過程	：72℃	97秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

上記で生成した反応液10μLを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、pheA欠失断片約1.6-kbが検出できた。

[0137] 上記のPCRにより増幅したコリネバクテリウム ダルタミカム R由来pheA欠失配列約1.6-kb DNA断片10μlと約4.4-kbのマーカーレス染色体遺伝子導入用プラスミドpCRA725 [J. Mol. Microbiol. Biotechnol., Vol. 8、243-254(2004)、(特開2006-124440)] 2μlを各々制限酵素PstI及びXbaIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μL、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3

時間反応させ、結合させた。これをライゲーションR液とした。

得られたライゲーションR液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素PstI及びXbaIでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpCRA725 約4.4-kbのDNA断片に加え、コリネバクテリウム グルタミカム株由来pheA欠失遺伝子(ライゲーションR液)の場合、長さ約1.6-kbの挿入断片が認められた。

コリネバクテリウム グルタミカム株由来pheA欠失遺伝子を含むプラスミドをpCRA725-pheA/CGと命名した。

[0138] コリネバクテリウム グルタミカム株poxF遺伝子破壊用プラスミドの構築

コリネバクテリウム グルタミカム株の染色体上poxF遺伝子のマーカーレス破壊用プラスミドを構築するために必要なDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際してコリネバクテリウム グルタミカム Rの配列を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製「394 DNA/RNA シンセサイザー(synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0139] poxF-1領域増幅用プライマー

(a-21); 5'-CTCT TCTAGA TACGTCCTAAACACCCGAC-3' (配列番号58)

(b-21); 5'-GACCAACCATTGCTGACTTGCGTATCCATAGTCAGGCTTC-3' (配列番号59)

尚、プライマー(a-21)には、XbaI制限酵素部位が付加されている。

[0140] poxF-2領域増幅用プライマー

(a-22); 5'-CAAGTCAGCAATGGTTGGTC-3 (配列番号60)

(b-22); 5'-CTCT TCTAGA TGATCAGTACCAAGGGTGAG-3' (配列番号61)

尚、プライマー (b-22) には、XbaI 制限酵素部位が付加されている。

[0141] 鋳型DNAは、コリネバクテリウム グルタミカムRから抽出した染色体DNAを用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバイオ株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

[0142] 反応液 :

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5μl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
鋳型 DNA	5μl (DNA 含有量 1μg 以下)
上記記載の 2 種プライマー*)	各々0.5μl (最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) poxF-1領域を増幅する場合はプライマー(a-21) と (b-21) の組み合わせ、poxF-2領域を増幅する場合はプライマー(a-22) と (b-22) で行った。

[0143] PCRサイクル :

デナチュレーション過程	: 94°C	60 秒
アニーリング過程	: 52°C	60 秒
エクステンション過程	: 72°C	
	poxF-1 領域	50 秒
	poxF-2 領域	50 秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0144] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、コリネバクテリウム グルタミカムpoxF-1 領域の場合約0.8-kb 、poxF-2 領域の場合約0.8-kb のDNA断片が検出できた。

[0145] 次に、上記のPCRにより増幅したpoxF-1 領域断片とpoxF-2 領域断片を1μlずつ混合し、PCRにより2種の断片の結合反応を行った。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバ

ィオ株式会社製）を用いて下記の条件で行った。

反応液 ：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5バl
25mM $MgCl_2$	5μl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl
上記記載の2種断片*	各々1バl
滅菌蒸留水	29.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*） poxF-1領域断片とpoxF-2領域断片で行った。

[0146] PGRサイクル ：

デナチュレーション過程	：95℃	20秒
アニーリング過程	：52℃	5秒
エクステンション過程	：72℃	50秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

[0147] さらに、得られたpoxF-1及びpoxF-2の結合断片を鋳型とし、PCRによりpoxF欠失断片の増幅を行った。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700（アプライド・バイオシステムズ社製）を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq（タカラバイオ株式会社製）を用いて下記の条件で行った。

[0148] 反応液 ：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5μl
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5おl
25mM $MgCl_2$	5リl
dNTP Mixture (2.5mM each)	8バl
鋳型DNA	5〃l (DNA含有量 1/ιg以下)
上記記載の2種プライマーペ	各々0.5μl (最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*） poxF欠失断片を増幅する場合はプライマー（a-21）と（b-22）の組み合

わせで行った。

[0149] PCRサイクル：

デナチユレーションョン過程	：95℃	20秒
アニーリング過程	：52℃	5秒
エクステンション過程	：72℃	97秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

上記で生成した反応液10μLを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、poxF欠失断片約1.6-kbが検出できた。

[0150] 上記のPCRにより増幅したコリネバクテリウム ダルタミカム R由来poxF欠失配列約1.7-kb DNA断片10μlと約4.4-kbのマーカーレス染色体遺伝子導入用プラスミドpCRA725［J. Mol. Microbiol. Biotechnol.、Vol. 8、243-254 (2004)、（特開2006-124440)］2μlを各々制限酵素XbaIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製）1unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションS液とした。

得られたライゲーションS液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、および1.5%寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素XbaIでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpCRA725約4.4-kbのDNA断片に加え、コリネバクテリウム ダルタミカム株由来pheA欠失遺伝子 (ライゲーションS液）の場合、長さ約1.7-kbの挿入断片が認められた。

コリネバクテリウム ダルタミカム株由来poxF欠失遺伝子を含むプラスミドをpCRA725-poxF/CGと命名した。

[0151] (6) 副生おお及びフエノール分解に関わる遺伝子破壊株の構築

マーカーレス染色体遺伝子導入用ベクターPCRA725 は、コリネバクテリウム ダルタミカムR内で複製不能なプラスミドである。pCRA725-pheA/CG を用いて、電気パルス法 [Agric. Biol. Chem.、Vol. 54、443-447 (1990) 及びRes. Microbiol.、Vol. 144、181-185 (1993)] により、コリネバクテリウム グルタミカムRを形質転換し、カナマイシン 50 μg/mLを含むA寒天培地（A液体培地、および1.5% 寒天）に塗布した。上記の培地で得られた一重交叉株を、10%(W/V) スクロース含有BT寒天培地 [$(NH_2)_2CO$ 2g、 $(NH_4)_2SO_4$ 7g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2 SO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mL 0.02% (w/v) biotin solution 1 mL 0.01% (w/v) thiamin solution 2 mlを蒸留水1Lに溶解、および1.5% 寒天] に塗付した。

プラスミドpCRA725-pheA/CG が染色体上の相同領域との一重交叉株の場合、pCRA725-pheA/CG 上のカナマイシン耐性遺伝子の発現によるカナマイシン耐性と、バチラス サブチリス (Bacillus subtilis) のsacR-sacB 遺伝子の発現によるスクロース含有培地での致死性を示すのに対し、二重交叉株の場合、pCRA725-pheA/CG 上のカナマイシン耐性遺伝子の脱落によるカナマイシン感受性と、sacR-sacB 遺伝子の脱落によるスクロース含有培地での生育性を示す。従って、マーカーレス染色体遺伝子破壊株は、カナマイシン感受性及びスクロース含有培地生育性を示す。

そこで、カナマイシン感受性及びスクロース含有培地生育性を示した株を選択した。このコリネバクテリウム ダルタミカムR株 pheA 遺伝子マーカーレス破壊株をコリネバクテリウム クリルタミカム (Corynebacterium glutamicum) PHE1と命名した（表1）。

[0152] 同様に、上記 (5) で構築した、コリネパクテリウム ダルタミカムR株においてフエノール2-モノオキシゲナーゼ活性を有する酵素をコードするpoxF 遺伝子マーカーレス破壊用プラスミドpCRA725-poxF/CG を用いて電気パルス法 [Agric. Biol. Chem.、Vol. 54、443-447 (1990) 及びRes. Microbiol.、Vol. 144、181-185 (1993)] により、コリネバクテリウム ダルタミカムΔ pheA 株を形質転換し、カナマイシン 50 μg/mLを含むA寒天培地に塗布した。上記の培

地で得られた一重交叉株を、10%(W/V) スクロース含有BT寒天培地に塗付しカナマイシン感受性及びスクロース含有培地生育性を選択した。

この得られたpheA 遺伝子及びpoxF 遺伝子マーカーレス破壊株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacter ium g Lutam icum) PHE2と命名した (表1）。

[0153] [表 1]

コリネパクテリウム グルタミカムの染色体遺伝子破壊株

菌株名	染色体破壊遺伝子	
PHE1	⊿pheA	
PHE2	⊿pheA	⊿poxF

[01 54] (7) _チロシン_フエノール-リアーゼ活性を有するtpL酵素遺伝子導入株の構築

上述のプラスミド6種類pCRB209-tp L/PA 、pCRB207-tp L/CB 、pCRB21 0-tpL/DH 、pCRB209-tp L/CA 、pCRB209-tp L/NP 及びpCRB209-tp L/TD を用いて、電気パルス法 [Agr ic. Bioし Chem. 、VoL. 54、443-447(1 990) 及びRes. Microb iol. 、VoL. 144 、18 1- 185(1 993)] により、コリネバクテリウム ダルタミカム R株を形質転換し、カナマイシン 50μg/m Lを含むA寒天培地に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりブラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記で作製のプラスミドpCRB209-tp L/PA 、pCRB207-tp L/CB 、pCRB21 0-tpL/DH 、pCRB209-tp L/CA 、pCRB209-tp L/NP 及びpCRB209-tp L/TD の導入が認められた。

得られた株をコリネ><クテリウム クつレタミカム (Corynebacter ium g Lutam icum) R/pCRB209-tp L/PA 、R/pCRB207-tp L/CB 、R/pCRB21 0-tpL/DH、R/pCRB209-tp L/CA 、R/pCRB209-tp L/NP 及びR/pCRB209-tp L/TD と命名した。

[01 55] (8) _フエノール生まま云子導入ほの糓築

上述のプラスミドpCRB209-tp L/PA を用いて、電気パルス法 [Agr iに BioL. Chem. 、VoL. 54、443-447(1 990) 及びRes. Microb ioし、VoL. 144 、18 1- 185(1993)] により、コリネパクテリウム ダルタミカムR株を形質転換し、カナマ

イシン 50μg/m Lを含むA寒天培地に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入プラスミドを確認した。この結果、上記で作製のプラスミドpCRB209-t p L/PA の導入が認められた。

得られた株をコリネバクテリウム グルタミカム (Co rynebac te r iu m g Lut am i cum) PHE3 と命名した。

[0156] また、上述のプラスミドpCRB209-t p L/PA 及びpCRB 1- a r oG/CG を用いて、電気パルス法 [Ag r i c. Bio し Chem. 、Vo L. 54、443-447 (1990) 及びRes. Mi c r ob i o し、Vo L. 144、18 1- 185 (1993)] により、コリネバクテリウム ダルタミカムR株を形質転換し、カナマイシン 50μg/m L及びクロラムフエニコール 5μg/m Lを含むA寒天培地に塗布した。尚、これら2種類のプラスミドは、コリネパクテリウム ダルタミカム内で共存可能なプラスミドである。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記で作製のプラスミドpCRB209-t p L/PA 及びpCRB 1- a r oG/CG の導入が認められた。得られた株をコリネバクテリウム グルタミカム (Co r ynebac te r ium g Lut am i cum) PHE4 と命名した。

[0157] 上述のプラスミドpCRB209-t p L/PA 、pCRB 1- a r oG/CG 及びpCRB 15-csm/CG を用いて、電気パルス法 [Ag r i c. Bio し Chem. 、Vo L. 54、443-447 (1990) 及びRes. Mi c r ob i o し、Vo L. 144、18 1- 185 (1993)] により、コリネバクテリウム グルタミカムR株を形質転換し、カナマイシン 50μg/m し クロラムフエニコール 5μg/m L及びゼオシン25μg/m Lを含むA寒天培地に塗布した。尚、これら3種類のプラスミドは、コリネバクテリウム ダルタミカム内で共存可能なブラスミドである。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記で作製のプラスミドpCRB209-t p L/PA 、pCRB 1- a r oG/CG 及びpCRB 15-csm/CG の導入が認められた。得られた株をコリネバクテリウム ダルタミカム (Co r y

nebac teｒiuｍ gLutamicum) PHE5と命名した。尚、本株の遺伝子組換えの概要は、表2にまとめて示した。

[0158] [表2]

フエノール生産遺伝子導入株

菌株名	宿主株	導入遺伝子 (遺伝子名／遺伝子起源)		
PHE3	Corynebacteirum	tpl/PA		
PHE4	glutamicum R	tpl/PA	aroG/CG	
PHE5	(野生株)	tpl/PA	aroG/CG	csm/CG

*) 表2内の表示の略語は以下の通り

<遺伝子起源略語>

PA ; パントエア アグロメランス

CG ; コリネバクテリウム グルタミカム R

[0159] <u>(9) 副生経路及びフエノール分解遺伝子破壊株へのフエノール生産遺伝子の導入</u>

上述のプラスミドpCRB209-tpL/PA、pCRB1-aroG/CG及びpCRB15-csm/CGを用いて、電気パルス法[Agric. Bioし Chem.、VoL. 54、443-447 (1990) 及びRes. Microbioし、VoL. 144、181-185(1993)]により、コリネバクテリゥム グルタミカムPHE1 (ΔpheA) 株、及びPHE2 (ΔpheA ΔpoxF) 株を形質転換し、カナマイシン50μg/mし クロラムフエニコール 5μg/mL及びゼオシン25μg/mLを含むA寒天培地に塗布した。尚、これら3種類のプラスミドは、コリネバクテリゥム ダルタミカム内で共存可能なプラスミドである。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりブラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記で作製のプラスミドpCRB209-tpL/PA、pCRB1-aroG/CG及びpCRB15-csm/CGの導入が認められた。PHE1 (ΔpheA) 株に導入した株をコリネパクテリゥム ダルタミカム (Corynebac teｒiuｍ gLutamicum) PHE6、PHE2 (Δ phθAΔ LdhA) 株に導入した株をコリネバクテリゥム ダルタミカム (Corynebac terium gLutaｍicum) PHE7と命名した。尚、本株の遺伝子組換えの概要は、表6にまとめて

示した。コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) PHE7は、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 (郵便番号292-0818) の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託した (受託日:2011年8月12日、受託番号:NITE BP-976) (原寄託の受託日:2010年8月31日、受託番号:NITE P-976)。

[0160] [表3]

遺伝子破壊株へのフエノール生産遺伝子の導入

菌株名	C. glutamicum 染色体破壊遺伝子		導入遺伝子 (遺伝子名／遺伝子起源)
PHE6	⊿pheA		tpl/PA, aroG/CG, csm/CG
PHE7	⊿pheA	⊿poxF	

*) 表内の表示の略語は以下の通り

<遺伝子起源略語>

PA ; パントエア アグロメランス

CG ; コリネバクテリウム グルタミカム R

[0161] 実施例3 t_D 遺伝子導入株におけるチロシン フエノール-リアーゼ活性測定

(1) チロシン フエノール-リアーゼの活性測定

実施例2 (7) において構築したチロシン フエノール-リアーゼ遺伝子を導入したコリネバクテリウム グルタミカムR/pCRB209-tpL/PA、R/pCRB207-tpL/CB、R/pCRB210-tpL/DH、R/pCRB209-tpL/CA、R/pCRB209-tpL/NP及びR/pCRB209-tpL/TDを、カナマイシン 50μg/mL含むA寒天培地 [$(NH_2)_2CO$ 2g、$(NH_4)_2SO_4$ 7g、KH_2PO_4 0.5 g、K_2HPO_4 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mL、0.02% (w/v) biotin solution 1 mL、0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL、yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、glucose 40 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに懸濁] に塗布し、28℃、20時間暗所に静置した。

上記のプレートで生育した各コリネバクテリウム グルタミカム チロシン

フエノール-リアーゼ遺伝子導入株を、カナマイシン50μg/mLを含むA液体培地[$(NH_2)_2CO$ 2g、$(NH_4)_2SO_4$ 7g、KH_2PO_4 0.5g、K_2HPO_4 0.5g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1mL、0.02% (w/v) biotin solution 1mL、0.01% (w/v) thiamin solution 2mL、yeast extract 2g、vitamin assay casamino acid 7g、glucose 40gを蒸留水1Lに溶解] 10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて16時間、好気的に振盪培養を行った。

[0162] 上記条件で生育したチロシン フエノール-リアーゼ遺伝子導入株を、カナマイシン50μg/mLを含有したA液体培地100mLに植菌し、33℃にて16時間、好気的に振盪培養を行った。コリネバクテリウム ダルタミカムRは、A培地にカナマイシンを添加しないこと以外は同様の条件にて培養した。

このようにして培養増殖されたそれぞれの菌体を、遠心分離(4℃、8,000×g, 10分)により回収した。ガラスビーズで菌体細胞を破砕した後、遠心分離(15,000 rpm, 20 min)によって得た細胞破砕上清を粗酵素液として用い、以下の方法によりTpL活性を測定した。

50 mM リン酸カリウムバッファー, pH 8.0, 2.5 mM L-Tyr, 0.1 mM ピリドキサールリン酸, 20% グリセロール、粗酵素液を混合し、30℃、30分間反応を行った。反応停止は0.6N 塩酸(終濃度)添加により行った。これをフィルターろ過後、生じたフエノールはHPLCで分析、定量した(Cosmosil C18 ARII, 移動相20% MeOH, 0.07% 過塩素酸)。酵素反応により生じたフエノールと、酵素比活性を表4に示した。

[0163] この結果、コリネバクテリウム ダルタミカムで発現させたパントエア アグロメランス株由来tpL遺伝子、シトロバクター ブラッキー株由来tpL遺伝子及びデスルフィトバクテリューム ハフニエンス株由来tpL遺伝子は特に高い活性を示し、クロロフレクサス オウランティアカス株由来tpL遺伝子、ノストック パンクチフオルメ株由来tpL遺伝子、トレポネマ デンティコラ株由来tpL遺伝子についても活性が認められた。

[0164]

[表4]

コリネバクテリウム グルタミカムの tpl 遺伝子組み換え株の活性測定

菌株名	導入遺伝子	比活性 (U/mg-protein)
R/pCRB209-tpl/PA	tpl (Pantoea agglomerans)	0.027
R/pCRB207-tpl/CB	tpl (Citrobacter braakii)	0.052
R/pCRB210-tpl/DH	tpl (Desulfitobacterium hafniense)	0.029
R/pCRB209-tpl/CA	tpl (Chloroflexus aurantiacus)	0.001
R/pCRB209-tpl/NP	tpl (Nostoc punctiforme)	0.001
R/pCRB209-tpl/TD	tpl (Treponema denticola)	0.002
Corynebacterium glutamicum R		0

[0165] 実施例4 コリネバクテリウム グルタミカム フエノール生産遺伝子導入株のフエノール牛成幸験

フエノール生産遺伝子であるチロシン フエノール-リアーゼ酵素活性を有する酵素をコードするパントエア アグロメランスのtpL遺伝子、DAHPシンテターゼをコードするコリネバクテリウム ダルタミカムのaroG 遺伝子、コリスミン酸ムターゼをコードするコリネバクテリウム ダルタミカムのcsm遺伝子の効果を調べる為に、コリネバクテリウム グルタミカム R株に各遺伝子を順番に積み重ねて導入し、フエノールの生産比較を行った。

実施例2で構築した (表2参照) PHE3(t p L遺伝子導入)、PHE4 (tp L遺伝子及びaroG 遺伝子導入) 及びPHE5 (tp L遺伝子、aroG 遺伝子及びcsm遺伝子導入) 株を、PHE3株はカナマイシン50μg/mし PHE4株はカナマイシン50μg/mL及びクロラムフエニコール5μg/mし PHE5株はカナマイシン 50μg/mし クロラムフエニコール 5μg/mL及びゼオシン25μg/mLを含むA寒天培地[$(NH_2)_2C0$ 2g、$(NH_4)_2S0_4$ 7g、KH_2P0_4 0.5 g、K_2HP0_4 0.5 g、$MgS0_4 . 7H_20$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2 S0_4 . 7H_20$ + 0.042% (w/v) $MnS0_4 . 2H_20$ 1 mし 0.02% (w/v) biotin soLution 1 mし 0.01% (w/v) thiamin solution 2 mし yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、gLucose 40 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに懸濁] に塗布し、28℃、20時間暗所に静置した。

[0166] 上記のプレートで生育したコリネバクテリウム ダルタミカム単一遺伝子導入株を、各抗生物質を含むA液体培地[$(NH_2)_2CO$ 2g、$(NH_4)_2SO_4$ 7g、KH_2PO_4 0.5g、K_2HPO_4 0.5g、$MgSO_4.7H_2O$ 0.5g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4.7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4.2H_2O$ 1mL 0.02% (w/v) biotin solution 1mL 0.01% (w/v) thiamin solution 2mL yeast extract 2g、vitamin assay casamino acid 7g、glucose 40gを蒸留水1Lに溶解]10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、28℃にて15時間、好気的に振盪培養を行った。

上記条件で生育したフエノール生産遺伝子導入株を、各抗生物質を含むA液体培地100mLに植菌し、33℃にて24時間、好気的に振盪培養を行った。

フエノールの定量は、サンプリングした反応液を遠心分離(4℃、15,000Xg、10分)し、得られた上清液を液体クロマトグラフィーで分析することにより行った。

結果を以下の表5に示す。コリネバクテリウム ダルタミカム PHE3は、24時間後に0.1mMのフエノールを、コリネバクテリウム ダルタミカム PHE4は、24時間後に0.4mMのフエノールを、コリネバクテリウム ダルタミカム PHE5は、24時間後に0.9mMのフエノールを培養液中に生産していた。すなわち、tpL遺伝子の導入によりグルコースからフエノール生成を可能とし、aroG遺伝子及びcsm遺伝子の導入による代謝改変により、フエノール生成量の増大を達成した。

[0167] [表5]

フエノール生産遺伝子導入株におけるフヱノール生成実験

菌株名	宿主株	導入遺伝子（導入遺伝子名／遺伝子起源）			フェノール生産量 (mM)
PHE3	Corynebacteirum glutamicum（野生株）	tpl/PA			0.1
PHE4		tpl/PA	aroG/CG		0.4
PHE5		tpl/PA	aroG/CG	csm/CG	0.9

*) 表内の表示の略語は以下の通り

<遺伝子起源略語>

PA; パントエア アグロメランス

CG; コリネバクテリウム グルタミカム R

[0168] 実施例5 フエノール生産遺伝子を導入した、副生経路及びフエノール分解遺伝子破壊株のフ| ノール生成実験

実施例2において構築したフエノール生産遺伝子発現プラスミドpCRB209-tpL/PA、pCRB1-aroG/CG 及びpCRB15-csm/CG を導入したコリネバクテリゥム グルタミカム染色体遺伝子マーカーレス破壊株PHE6(Δ pheA)、及びPHE7(Δ pheA Δ poxF) 株を、カナマイシン 50μg/mL、クロラムフエニコール 5μg/mL及びゼオシン25μg/mL含むA寒天培地 [$(NH_2)_2CO$ 2g、$(NH_4)_2SO_4$ 7g、KH_2PO_4 0.5 g、K_2HPO_4 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mL、0.02% (w/v) biotin solution 1 mL、0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL、yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、glucose 40 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに懸濁] に塗布し、28℃、20時間暗所に静置した (表6)。

[0169] 上記のプレートで生育したフエノール生産遺伝子導入株を、カナマイシン50μg/mL、クロラムフエニコール 5μg/mL及びゼオシン25μg/mLを含むA液体培地[$(NH_2)_2CO$ 2g、$(NH_4)_2SO_4$ 7g、KH_2PO_4 0.5 g、K_2HPO_4 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.042% (w/v) $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mL、0.02% (w/v) biotin solution 1 mL、0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL、yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、gLucose 40 gを蒸留水1Lに溶解] 10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて16時間、好気的に振盪培養を行った。

上記条件で生育したフエノール生産遺伝子導入株を、カナマイシン50μg/mL、クロラムフエニコール 5μg/mL及びゼオシン25μg/mL を含有したA液体培地100mLに植菌し、33℃にて24時間、好気的に振盪培養を行った。

フエノールの定量は、サンプリングした反応液を遠心分離 (4℃、15,000Xg、10分) し、得られた上清液を液体クロマトグラフィーで分析することにより行った。

[0170] この結果、24時間後に、コリネバクテリウム ダルタミカム野生株を宿主としたPHE5は、24時間後に0.9 mMのフエノールを生成したのに対して、pheA 遺伝子を破壊したコリネバクテリウム ダルタミカムを宿主としたPHE6は、5.8 mMのフエノールを、pheA 及びpoxF 遺伝子を破壊したコリネバクテリウム ダルタミカムを宿主としたPHE7は、6.9 mMのフエノールを生成していた。

すなわち、フエニールアラニンへの副生経路を遮断したpheA 遺伝子破壊、及びフェノールの分解経路を遮断したpoxF 遺伝子破壊による代謝工学的改変により、順次フェノール生産性の向上が達成された。

[0171] [表6]

フエノール生産遺伝子を導入した、副生経路及びフェノール分解遺伝子破壊株のフェノール生成実験

菌株名	導入遺伝子	宿主染色体破壊遺伝子		フェノール生産量 (mM)
PHE5	tpl/PA aroG/CG csm/CG	Corynebacteirum glutamicum (野生株)		0.9
PHE6		⊿pheA		5.8
PHE7		⊿pheA	⊿poxF	6.9

*) 表内の表示の略語は以下の通り

<遺伝子起源略語>

PA ; パントエア アグロメランス

CG ; コリネバクテリウム グルタミカム

[0172] <u>実施例6 コリネバクテリウム グルタミカムPHE7を用いた還元条件下におけるフエノール生成実験</u>

実施例2で創製したコリネバクテリウム ダルタミカムPHE7フエノール生成株を、カナマイシン50μg/mし クロラムフエニコール 5μg/m L及びゼオシン25μg/m L を含有したA寒天培地に塗布し、28℃、20時間暗所に静置した。

上記のプレートで生育したコリネバクテリウム ダルタミカムPHE7フエノール生成株を、カナマイシン50μg/mし クロラムフエニコール 5μg/m L及びゼオシン25μg/m L を含有したA液体培地10mLの入った試験管に一白金耳植菌し

、28℃にて15時間、好気的に振盪培養を行った。

上記条件で生育したコリネバクテリウム ダルタミカムPHE7フエノール生成株を、カナマイシン50μg/mL クロラムフエニコール 5μg/mL及びゼオシン25μg/mL を含有したA液体培地500mLの入つた容量2Lの三角フラスコに植菌し、28℃にて15時間、好気的に振盪培養を行った。

[0173] このようにして培養増殖されたそれぞれの菌体は、遠心分離(4℃、5,000×g, 15分)により菌体を回収した。得られた菌体を、終濃度OD_{610}=35となるようにBT(-尿素)液体培地〔0.7%硫酸アンモニウム、0.05%リン酸二水素カリウム、0.05%リン酸水素二カリウム、0.05%硫酸マグネシウム・7水和物、0.0006%硫酸鉄・7水和物、0.00042%硫酸マンガン水和物、0.00002%ビオチン、0.00002%チアミン塩酸塩〕に懸濁した。このそれぞれの菌体懸濁液60mLを容量100mLメディウム瓶に入れ、還元条件下(酸化還元電位;-450 mV)、グルコースを8%となるように添加し、33℃に保つた水浴中で攪拌しながら反応させた。この時、反応液のpHが7.0を下回らないように2.5Nのアンモニア水を用いてpHコントローラー(エイプル株式会社製、型式:DT-1023)でコントロ—ルしながら反応した。

サンプリングした反応液を遠心分離(4℃、15,000×g、10分)し、得られた上清液を用いてフェノールの定量を行った。

この結果、コリネバクテリウム ダルタミカムPHE7フエノール生成株は、還元条件下における反応において、好気培養と比較して高い生産性を示し、24時間後に11.3 mMのフエノールを生成していた。

産業上の利用可能性

[0174] 本発明方法によれば、微生物を用いて実用的な効率でフエノールを製造することができる。

請求の範囲

[請求項1] チロシン フエノール-リアーゼ (tyros ine pheno L- Lyase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、フエノール生産能を有する形質転換体。

[請求項2] チロシン フエノール-リアーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が、パントエア アグロメランス (Pantoea agg Lomerans) 由来の遺伝子、シトロバクター プラッキー (cit robacter braak ii) 由来の遺伝子、デスルフィトバクテリューム ハフニエンス (Desu Lf i tobacter ium hafn iense) 由来の遺伝子、クロロフレクサス オウランティアカス (Ch Lorof Lexus aurant i acus) 由来の遺伝子、ノストック パンクチフォルメ (Nostoc punct i forme) 由来の遺伝子、又はトレポネマ デンティコラ (Treponema dent ico La) 由来の遺伝子である請求項1に記載の形質転換体。

[請求項3] チロシン フエノール-リアーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が下記の (a) 又は (b) のDNAである請求項1に記載の形質転換体。

(a) 配列番号36の塩基配列からなるDNA、配列番号39の塩基配列からなるDNA、配列番号42の塩基配列からなるDNA、配列番号45の塩基配列からなるDNA、配列番号48の塩基配列からなるDNA、又は配列番号51の塩基配列からなるDNA

(b) (a) の何れかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイプリダイズし、かつチロシン フエノール-リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

[請求項4] 宿主のコリネ型細菌が、その染色体上に存在する下記 (c) 及び/又は (d) の遺伝子が破壊され、又は欠損したものである、請求項1～3の何れかに記載の形質転換体。

(c) プレフエン酸デヒドラターゼ (prephenate dehydratase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子

(d) フエノール2-モノオキシケナーセ (pheno L 2-monooxyqenase)

活性を有する酵素をコードする遺伝子

[請求項5] 宿主のコリネ型細菌の以下の(e)及び/又は(f)の代謝遺伝子が、宿主で高発現している請求項1～4の何れかに記載の形質転換体。

(e) DAHPシンテターゼ(3-deoxy-D-arab i no-heptu Losonate 7-phosp hate (DAHP) synthase)活性を有する酵素をコードする遺伝子

(f) コリスミン酸ムターゼ(chor i smate mutase)活性を有する酵素をコードする遺伝子

[請求項6] 宿主のコリネ型細菌がコリネバクテリウム ダルタミカムである請求項1～5の何れかに記載の形質転換体。

[請求項7] 宿主のコリネバクテリウム ダルタミカムが、コリネバクテリウム グルミカムR (FERM P—18976)、ATCC 13032, 又はATCC1 3869である請求項6に記載の形質転換体。

[請求項8] 宿主のコリネバクテリウム ダルタミカムが、コリネバクテリウム グルミカムR (FERM P_ 18976)、ATCC1 3032、又はATCC1 3869の染色体上に存在する下記(c)及び/又は(d)の遺伝子が破壊され、又は欠損したものである、請求項6に記載の形質転換体。

(c) プレフェン酸デヒドラターゼ(prephenate dehydratase)活性を有する酵素をコードする遺伝子

(d) フエノールル2-モノオキシケナーセ(pheno L 2-monooxygenase)活性を有する酵素をコードする遺伝子

[請求項9] 宿主のコリネバクテリウム ダルタミカムが、コリネバクテリウム グルミカムR (FERM P_ 18976)、ATCC1 3032、又はATCC 13869において、以下のお)及び/又は(f)の代謝遺伝子が高発現しているものである、請求項6又は8に記載の形質転換体。

(e) DAHPシンテターゼ(3-deoxy-D-arab i no-heptu Losonate 7-phosp hate (DAHP) synthase)活性を有する酵素をコードする遺伝子

(f) コリスミン酸ムターゼ(chor i smate mutase)活性を有する酵素をコードする遺伝子

[請求項10] コリネバクテリウム ダルタミカム PHE7 (受託番号 :NITE BP-976) 形質転換体。

[請求項11] 請求項1~10の何れかに記載の形質転換体を、還元条件下、糖類を含有する反応液中で反応させる工程と、反応液中のフエノールを回収する工程とを含むフェノールの製造方法。

[請求項12] 反応工程において、形質転換体が実質的に増殖しない請求項11記載のフヱノールの製造方法。

[請求項13] 還元条件下の反応液の酸化還元電位が—200〜−500ミリボルトである請求項11又は12に記載のフヱノールの製造方法。

[請求項14] 糖類がグルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、ァラピノース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、トレハロース、及びマンニトールからなる群より選ばれるものである請求項11~13の何れかに記載のフエノールの製造方法。

［図1］

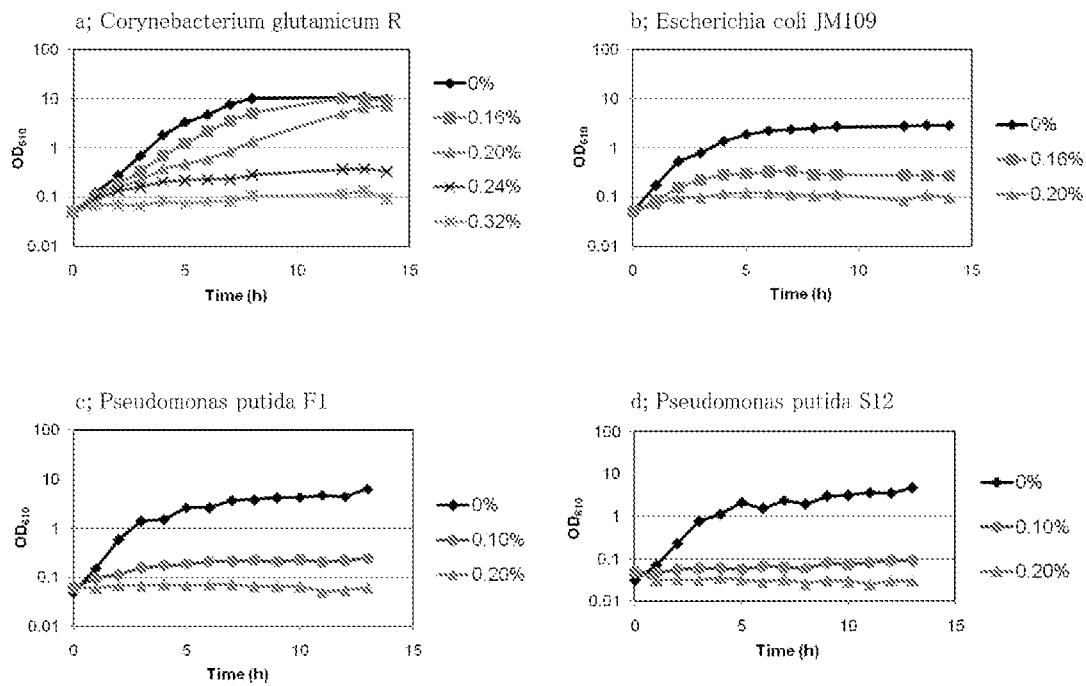



図１　好気増殖に及ぼすフェノールの影響

［図2］

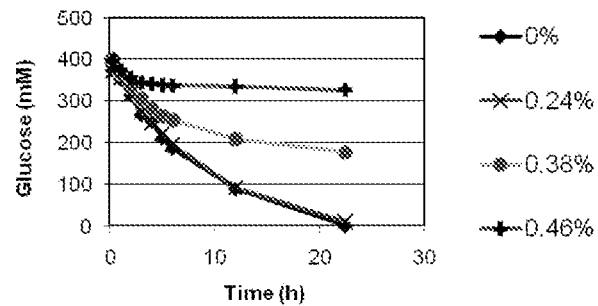



図２　還元条件下での糖代謝に及ぼすフェノールの影響

[図3]

pCASE1 ori
gapA promoter
1
tpl/CB
pCRB207-tpl/CB
6491 bp
pUC ori
rRNA terminator
Km^r

pCASE1 ori
gapA promoter
1
tpl/DH
pCRB210-tpl/DH
6494 bp
pUC ori
rRNA terminator
Kmr

pCASE1 ori
gapA promoter
1
aroG/CG
pCRB209-aroG/CG
6521 bp
pUC ori
rRNA terminator
Kmr

pCASE1 ori
gapA promoter
1
csm/CG
rRNA terminator
pCRB209-csm/CG
5426 bp
pUC ori
Kmr

pCASE1 ori
gapA promoter
1
tpl/PA
pCRB209-tpl/PA
6491 bp
pUC ori
rRNA terminator
Kmr

pCASE1 ori
gapA promoter
1
tpl/CA
pCRB209-tpl/CA
6539 bp
pUC ori
rRNA terminator
Kmr

pCASE1 ori
gapA promoter
1
tpl/NP
pCRB209-tpl/NP
6524 bp
pUC ori
rRNA terminator
Kmr

pCASE1 ori
gapA promoter
1
tpl/TD
pCRB209-tpl/TD
6500 bp
pUC ori
rRNA terminator
Kmr

[図4]

BamHI
gapA promoter
pCASE1 ori
1
pCRB209-aroG/CG
6521 bp
aroG/CG
pUC ori
rRNA terminator
Km^r
BamHI
BamHI
Cm^r
1
pUC ori
pCRB1
4051 bp
pBL1 ori
BamHI
gapA promoter
Cm^r
1
aroG/CG
pCRB1-aroG/CG
6461 bp
pBL1 ori
rRNA terminator
BamHI
pUC ori

BamHI
gapA promoter
pCASE1 ori
1
csm/CG
pCRB209-csm/CG
5426 bp
rRNA terminator
BamHI
pUC ori
Km^r
Ze^r
1
BamHI
pCG1 ori
pCRB15
3757 bp
pUC ori
Ze^r
pCG1 ori
1
BamHI
gapA promoter
pCRB15-csm/CG
5071 bp
csm/CG
rRNA terminator
pUC ori
BamHI

X

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/070325

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09 (2006.01)i, C12N1/21 (2006.01)i, C12P7/22(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12N1/21, C12P7/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 3-240492 A (Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd.), 25 October 1991 (25.10.1991), (Family: none)	1, 6 2, 3, 7 4, 5, 8-14
A	JP 63-222682 A (Ajinomoto Co., Inc.), 16 September 1988 (16.09.1988), (Family: none)	1 2, 3, 6, 7 4, 5, 8-14
A	JP 2006-320238 A (Mitsui Chemicals, Inc.), 30 November 2006 (30.11.2006), (Family: none)	2, 3, 6, 7 1, 4, 5, 8-14
A	Hiaeaki YUKAWA, "Sekai no Biorefinery Doko to RITE no Kenkyu Kaihatsu", Chemical industrial economy, 01 May 2010 (01.05.2010), vol.57, no.6, pages 49 to 54	2, 3, 6, 7 1, 4, 5, 8-14

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibnion or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 September, 2011 (26.09.11)	04 October, 2011 (04.10.11)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japanese Patent Office	
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/070325

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WIERCKX NJ et al., Engineering of solvent-tolerant Pseudomonas putida S12 for bioproduction of phenol from glucose, Appl. Environ. Microbiol., 2005, Vol.71, No.12, pp.8221-8227	1-14
A	WIERCKX NJ et al., Transcriptome analysis of a phenol-producing Pseudomonas putida S12 construct: genetic and physiological basis for improved production, J. Bacteriol., 2008, Vol.190, No.8, pp.2822-2830	1-14
A	SAKAI S et al., Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested Corynebacterium glutamicum R, Appl. Environ. Microbiol., 2007, Vol.73, No.7, pp.2349-2353	1-14
A	JP 2006-262824 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 05 October 2006 (05.10.2006), (Family: none)	1-14
A	LUTKE-EVERSLOH T et al., Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, Vol.77, No.4, pp.751-762	1-14
A	LI PP et al., Genetic and biochemical identification of the chorismate mutase from Corynebacterium glutamicum, Microbiology, 2009, Vol.155, Pt.10, pp.3382-3391	1-14
A	HSU SK et al., Mutational analysis of feedback inhibition and catalytic sites of prephenate dehydratase from Corynebacterium glutamicum, Arch. Microbiol., 2004, Vol.181, No.3, pp.237-244	1-14
A	Masayuki INUI et al., "A RITE perspective on global biorefinery R&D trends", Cellulose Commun., 2009, vol.16, no.4, pages 151 to 156	1-14
A	JP 9-279 A (Nippon Shokubai Co., Ltd.), 07 January 1997 (07.01.1997), (Family: none)	1-14
P, A	Hideaki YUKAWA, "Biorefinery: World Trends and RITE'S R&D〃, Chemical Engineering of Japan, 2011.01, vol.75, no.1, pages 23 to 25	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP2011/070325

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09 (2006.01)i, C12N1/21 (2006.01)i, C12P7/22 (2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/21, C12P7/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	JP 3-240492 A (三菱油化株式会社) 1991.10.25, (ファミリーなし)	1,6 2,3,7 4,5,8—14
X Y	JP 63-222682 A (味の素株式会社) 1988.09.16, (ファミリーなし)	1 2,3,6,7 4,5,8—14

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。 □ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
26.09.2011	04.10.2011

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員） 4N 3435
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100—8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	西村 亜希子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	JP 2006-320238 A（三井化学株式会社）2006. 11. 30, （ファミリーなし）	2,3,6,7 1,4,5,8-14
Y A	湯川英明，世界のバイオリファイナリー動向とRITEの研究開発，化学経済，2010. 05. 01，Vol. 57，No. 6，pp. 49-54	2,3,6,7 1,4,5,8-14
A	WIERCKX NJ et al., Engineering of solvent-tolerant Pseudomonas putida S12 for bioproduction of phenol from glucose, Appl. Environ. Microbiol., 2005, Vol. 71, No. 12, pp. 8221—8227	1-14
A	WIERCKX NJ et al., Transcriptome analysis of a phenol-producing Pseudomonas putida S12 construct: genetic and physiological basis for improved production, J. Bacteriol., 2008, Vol. 190, No. 8, pp. 2822-2830	1-14
A	SAKAI S et al., Effect of lignocellulose-derived innibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested Corynebacterium glutamicum R, Appl. Environ. Microbiol., 2007, Vol. 73, No. 7, pp. 2349-2353	1-14
A	JP 2006-262824 A（住友ベークライト株式会社）2006. 10. 05, （ファミリーなし）	1-14
A	LUTKE-EVERSLOH T et al., Perspectives of biotechno logical production of L-tyrosine and its applications, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, Vol. 77, No. 4, pp. 751—762	1-14
A	LI PP et al., Genetic and biochemical identification of the chorismate mutase from Corynebacterium glutamicum, Microbiology, 2009, Vol. 155, Pt. 10, pp. 3382—3391	1-14
A	HSU SK et al., Mutational analysis of feedback inhibition and catalytic sites of prephenate dehydratase from Corynebacterium glutamicum, Arch. Microbiol., 2004, Vol. 181, No. 3, pp. 237-244	1-14
A	乾将行ほか，バイオリファイナリーを取り巻く世界の現状とRITEの研究開発，Cellulose Coraraun., 2009, Vol. 16, No. 4, pp. 151- 156	1-14
A	JP 9-279 A（株式会社日本触媒）1997. 01. 07,（ファミリーなし）	1-14

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
P, A	湯川英明，バイオリファイナリー :世界の動向とRITE の研究開発，化学工学，2011. 01，Vol. 75, No. 1, pp. 23-25	1—14